



NOUVELLES SONDES NUCLEIQUES POUR LA MESURE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES DE REPARATION DES DOMMAGES DE L'ADN PAR UN TEST FRET

Alexia Chollat-Namy

► To cite this version:

Alexia Chollat-Namy. NOUVELLES SONDES NUCLEIQUES POUR LA MESURE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES DE REPARATION DES DOMMAGES DE L'ADN PAR UN TEST FRET. In: ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00106970

HAL Id: tel-00106970

<https://theses.hal.science/tel-00106970>

Submitted on 16 Oct 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE
Présentée par

Alexia CHOLLAT-NAMY

Née le 24 Février 1977 à Toulouse (31)

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER- GRENOBLE I
Discipline : Biochimie, Biotechnologie Santé et Management

**Nouvelles sondes nucléiques pour la mesure d'activités
enzymatiques de réparation des dommages de l'ADN par un
test de fluorescence**

Date de soutenance : 6 Octobre 2006

Jury

M. Dimitar ANGUELOV	Directeur de recherche CNRS, ENS Lyon	(Rapporteur)
M. Pablo RADICELLA	Directeur de recherche, CEA Fontenay-aux-Rose	(Rapporteur)
M. François BERGER	Professeur, UJF Grenoble	(Examineur)
M. Ali LAAYOUN	Ingénieur de recherche, Biomérieux Grenoble	(Examineur)
M. Didier GASPARUTTO	Ingénieur de recherche, CEA Grenoble	(Co-directeur de thèse)
M. Alain FAVIER	Professeur, UJF Grenoble	(Directeur de thèse)

Thèse préparée au sein du laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques
LCIB (UMR-E 3 CEA-UJF)/DRFMC/Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble

Remerciements

Adresser ses remerciements est un exercice périlleux, lorsqu'il s'agit d'exprimer la reconnaissance que l'on porte aux personnes qui ont su vous aider, vous guider de façon désintéressée et vous conseiller à juste titre, au cours d'un long cursus scolaire. Néanmoins, c'est aujourd'hui grâce à elles que je peux clore, définitivement cette fois (une thèse de Pharmacie ne m'avait pas suffi...), le chapitre de mes études. Cette thèse représente en effet le point final de presque 10 ans de bons et loyaux services à l'Université de Médecine Pharmacie Joseph Fourier de Grenoble.

A ce titre, j'aimerais tout d'abord adresser mes remerciements à monsieur le Professeur Alain FAVIER, mon directeur de thèse et directeur du laboratoire qui m'a accueillie durant ces trois années. C'est au sein du Laboratoire d'études des Lésions des Acides Nucléiques (LAN), Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologique (LCIB), Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée (DRFMC) du CEA Grenoble (UMR-E n°3 CEA-UJF) que j'ai pu effectuer ce travail. Veuillez trouver en ces quelques lignes, Monsieur, l'expression de ma sincère gratitude pour avoir tenté de me guider à travers le labyrinthe de ma longue scolarité.

Mes remerciements sont également adressés à Madame Pascale MALDIVI, chef du Service de Chimie Inorganique et Biologique, au sein duquel j'ai pu passer ces trois années.

J'adresse mes remerciements à mon « Big Chief », Monsieur Didier GASPARUTTO. Merci pour toute l'attention, l'écoute, la confiance et l'autonomie que tu m'as accordées, ainsi que pour ta gentillesse et ta constante bonne humeur.

Je remercie Messieurs Pablo RADICELLA et Dimitar ANGELOV pour avoir jugé ce travail. Mes remerciements vont également à Monsieur François BERGER et Monsieur Ali LAAYOUN pour avoir accepté notre invitation à ce jury.

Puis viennent les remerciements en cascade...

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement Sylvie, Jean-Luc et Thierry, chacun individuellement pour tous les moments partagés, outre les discussions scientifiques et autres « bugs » informatiques, ainsi que pour leur bienveillance, leur soutien et leurs encouragements permanents. Les mots résonnent bien faiblement en comparaison de la reconnaissance que je leur porte.

Merci à Monsieur Jean CADET, pour sa perpétuelle disponibilité à mon égard, ses conseils scientifiques, et pour avoir accepté au milieu de ses nombreuses conférences, d'avoir lu et corrigé ce manuscrit.

Merci à Madame Christine SAINT-PIERRE, pour les analyses MALDI, ainsi qu'à la p'tite Soph', qui depuis l'Angleterre nous a fait et refait des extraits cellulaires. Mes remerciements vont également à Madame Dorothee JARY, du LETI, qui a dû s'arracher au moins autant de cheveux que moi pour les calculs de cinétique enzymatique sur puce et enfin à l'équipe du Pr. Wim Burmeister, de l'IVMS/EMBL pour l'UGi (merci à Thibaut et à Marlyse !!).

Comment oublier mon « boulet favori » ? Mon confident (malgré lui...) de tous les instants (il n'a pas eu le choix, le pauvre...), mon cher « officemate », Olivier le Magnifique ! Merci de m'avoir supportée et d'avoir accompagné (à défaut de les fuir) tous mes délires...Bon courage pour la fin de ta thèse !!

C'est à l'ensemble de cette équipe chaleureuse et dynamique que je tiens à dire merci pour m'avoir intégrée et donné la motivation ainsi que l'énergie, nécessaires pour mener à bien la tâche qui m'était dévolue. Merci à Sylvain, merci à Francette, merci à Fanny et John, mes deux inséparables étudiants de Master, un gros merci à Sandrine pour m'avoir enseigné l'art de l'HPLC (ou comment perdre son flegme légendaire en moins de deux...) et aux autres que j'oublie forcément de citer.

Etre épaulée dans son travail, c'est bien. Etre entourée, écoutée et comprise quotidiennement dans sa vie personnelle, c'est encore mieux. A cet égard, c'est plus qu'un simple remerciement que j'adresse ici à plusieurs personnes. Evidement, ma famille, mes parents, mes frères savent à quel point ils ont été importants, et ce, à chaque étape de mon parcours. Il est normal et implicite de leur rendre hommage à juste titre.

Ils n'ont cependant pas été les seuls à me supporter, jour après jour...Merci à toi, ma Carinette, d'avoir été là, disponible et proche à chaque instant. Ca n'aurait pas été pareil sans toi... J'espère de tout cœur que nous continuerons à partager nos loisirs et nos passions communes.

Merci à toi aussi, ma Zozote, notre dévouée (et crainte !!) « Reine du Service ». Ma très chère Zohra, je t'adresse un merci tout particulier, pour ton égale gentillesse et ton amitié, tous les services rendus et ton dévouement sans pareil, sans parler des nos pauses thé qui me manqueront à coup sûr...

Enfin, mon P'tit Loup préféré trouvera dans ces quelques lignes toute ma reconnaissance et ma gratitude (et bien d'autres choses encore) pour avoir enduré mon stress, mes hauts et mes bas, avec une constance et une endurance sans faille.

Table des matières

<i>Abréviations.....</i>	p.8
<i>I. L'ADN : Structure, fonctions et altérations.....</i>	p.10
<i>II. Synthèse des sondes oligonucléotidiques : théorie et mise en œuvre</i>	p.72
<i>III. Validation et étude de l'efficacité des sondes « FRET ».....</i>	p.100
<i>IV. Mesure de plusieurs activités enzymatiques de réparation à l'aide des sondes fluorescentes à partir d'enzymes purifiées ou d'extraits cellulaires</i>	p.134
<i>V. Réparation enzymatique en nano volumes : Application des sondes fluorescentes en solution sur micropuce</i>	p.168
<i>VI. Discussion Conclusion</i>	p.184
<i>Liste des publications et conférences</i>	p.204
<i>Annexe 1 : Transfection de sondes FRET pour l'étude de la réparation de l'ADN in cellulo.....</i>	p.210
<i>Annexe 2 : Application des sondes FRET à l'étude de la réparation par réversion, par l'enzyme hAGT.....</i>	p.221
<i>Annexe 3 : Matériel et Méthodes.....</i>	p.241

Abréviations

ADN	: acide désoxyribonucléique
AMPc	: adénine mono-phosphate cyclique
AP Lyase	: apurique/ apyrimidique Lyase (génèse d'un site abasique)
ARN	: acide ribonucléique
ATP	: adénosine triphosphate
APE1	: AP Endonucléase 1
BER	: Réparation par Excision de Bases
CAT	: Chloramphénicole acétyle transférase
CHO	: Chinese Hamster Ovary cells : lignée cellulaire de cellules ovarienne de Hamster chinois
CLHP	: Chromatographie liquide haute performance
CLHP-SM/SM	: Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse mode tandem
CPG	: Controlled Pore Glass
d(N)TP	: désoxy (N) tri-phosphate, N représentant l'une des 5 bases : A,T,G,C ou U
DABCYL	: 4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoic acid
DMTr ⁺	: cation diméthoxytrytile
EBV	: Epstein Barr Virus ou virus de la mononucléose infectieuse
EDTA	: acide éthylène diamine tétra acétique
EGPA	: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
EWOD Chip	: ElectroWetting On Dielectric microchip
Endo III (E III)	: Endonucléase III
FCS	: Spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence
Fluo (-dT)	: Fluorescéine
Fpg	: Formamidopyrimidine DNA glycosylase
FRET	: Fluorescence Resonance Energy Transfert (transfert résonnant d'énergie de fluorescence)
HCR	: Host Cell Reactivation : Test de réactivation en cellules hôtes
Hairpin	: Oligonucléotide de structure en « épingle à cheveux »
HTS	: High throughput screening : analyse à haut débit
K _m	: constante de Michaelis (affinité de l'enzyme pour son substrat)
MALDI-TOF	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
MBD ₄ (MED1)	: Methyl CpG Endonucléase 1
MMR	: Réparation des Mésappariements
NER	: Réparation par Excision de Nucléotides
NFO	: Endonucléase IV
NP1	: Nucléase P1
ODNs	: oligodésoxynucléotides
OGG	: 8-oxoguanine DNA glycosylase
OLISA	: Oligo sorbent assay
PCR	: Polymerase Chain Reaction : réaction de polymérisation en chaîne
Rhod	: Rhodamine
RR	: Réparation par Réversion
ROS	: Reactive Oxygen Species : espèces réactives de l'oxygène
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
SOD	: Super Oxyde Dismutase
SCGE	: Single cell gel electrophoresis : Technique des Comètes
Si RNA	: Silencing RNA
TEAA	: Acétate de Triéthylammonium
TDG	: Thymine DNA Glycosylase
T _m	: Température de fusion
Tg	: Thymine Glycol
Ura	: lésion uracile (dans l'ADN)
UA _{260nm}	: Unité Absorbance de densité optique à 260 nm
UNG/UDG	: Uracile DNA-Glycosylase
UGi	: Inhibiteur de l'UNG
UV	: Ultra Violet
V _{ini}	: vitesse initiale
V _{max}	: vitesse maximale
XRCC1	: X-ray Repair Cross-complementing group 1

Première partie

L'ADN: Structure, fonctions et altérations

Première Partie

L'ADN : Structure, Fonctions et Altérations

I.	Structure de l'ADN	14
A.	Structure primaire de l'ADN	14
B.	Structure secondaire de l'ADN.....	15
II.	Rôle biologique de l'ADN:	17
A.	La synthèse protéique	17
B.	La transmission des caractères héréditaires et de l'information génétique.....	18
1.	Mécanisme de réplication de l'ADN	18
2.	La division cellulaire	19
III.	L'ADN : biopolymère cible d'agressions : Les altérations du support de l'information génétique	20
A.	Les altérations spontanées	21
1.	La réplication source d'erreurs	21
2.	Instabilité chimique des acides nucléiques	21
B.	Les espèces réactives dérivées de l'oxygène	22
C.	Les méthylations non enzymatiques	23
D.	Les effets du rayonnement solaire	24
E.	Les radiations ionisantes	25
F.	Les agents chimiques exogènes	25
IV.	Conséquences biologiques des agressions de l'ADN et réponse mise en œuvre par la cellule.....	26
A.	La réparation par Excision de Nucléotides (NER).....	27
B.	La réparation des cassures doubles brins.....	29
C.	La réparation des mésappariements (MMR)	30
D.	La réparation par réversion (RR)	30
1.	Les différentes enzymes impliquées	30
2.	Les glycosylases et la réparation des bases alkylées.....	31
3.	Les enzymes de réparation par réversion et le développement des traitements anticancéreux : inhibition enzymatique volontaire	31
E.	La réparation par Excision de Bases (BER)	32
1.	Généralités	32
2.	Mécanismes d'action des glycosylases	33
V.	Les principales ADN N-glycosylases intervenant dans la Réparation par Excision de Bases.	36
A.	L'UNG et la réparation de l'uracile dans l'ADN.....	36
B.	La réparation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine par le système OG	38
1.	Réparation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine appariée à une cytosine	40
a	Le système Procaryote : La Formamidopyrimidine glycosylase Fpg (Mut M)	40
b	Le système eucaryote et la 8-oxo-7,8-dihydroguanine glycosylase 1 : l'enzyme OGG1....	40
2.	Réparation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine appariée à une adénine et maintien du pool de dGTP : MYH et MTH: Mut Y et Mut T homologues	42
C.	L'endonucléase III (Endo III et homologue de NTH1)	42
D.	Déficiences dans le système de Réparation par Excision de Bases : implications dans certaines pathologies	43
1.	Déficience de MYH.....	44
2.	Déficience de OGG1.....	44
3.	Déficience d'autres enzymes impliquées dans le BER	45
VI.	Suivi de la réparation des dommages: Différentes techniques utilisées pour la mesure de la réparation des lésions de l'ADN.....	46
A.	Mesures du taux de dommages dans l'ADN	46
1.	Réparation et méthodes radioactives.....	46
2.	Réparation et techniques chromatographiques	47
3.	Réparation au niveau cellulaire : le test des Comètes et l'élution alcaline	48
B.	Mesures biologiques utilisant un vecteur exogène lésé.....	51
1.	Test de réactivation en cellule hôte : « Host cell reactivation assay »	51
2.	Suivi de la réparation par excision-resynthèse : les puces plasmides.....	52
C.	Méthodes physicochimiques utilisant des sondes synthétiques portant les lésions.....	52

1.	L'analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide (EGPA)	52
2.	Réparation suivie par fluorescence sur support	53
3.	Réparation et analyse par spectrométrie de masse	54
4.	Intérêt du FRET pour la réparation	55
VII.	Qu'est ce que le FRET ?	55
A.	Principe	55
B.	Applications biologiques du FRET	57
1.	FRET et étude moléculaire structurale	57
2.	FRET et dynamique cellulaire	58
3.	Amélioration des sondes et conséquences analytiques	58
4.	Fluorescence et détection d'activités enzymatiques	59

L'ADN : Structure, Fonctions et Altérations

I. Structure de l'ADN

Une des plus grandes découvertes du XXe siècle a été l'élucidation en 1953 par le biologiste américain James Watson et le physicien britannique Franck Crick de la nature chimique du matériel génétique, l'ADN (Watson & Crick, 1953). Chargé de transmettre le patrimoine génétique héréditaire, l'ADN compte parmi les plus grosses molécules chez l'homme. Cette molécule forme une pelote microscopique enroulée dans le noyau des cellules et organelles cellulaires (chez les organismes eucaryotes, c'est-à-dire constitués de cellules munies d'un noyau, de mitochondries ou de chloroplastes) ou dans le cytoplasme (chez les procaryotes, cellules dénuées de noyau, comme les bactéries). Dans le noyau, l'ADN est enroulé autour d'histones (protéines) pour former les nucléosomes. L'ensemble de ces sous-unités constitue la fibre de chromatine. Selon la phase du cycle cellulaire, la fibre chromatinienne est repliée en une structure plus ou moins condensée et forme alors les chromosomes.

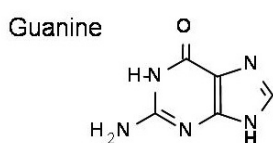
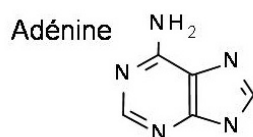
A. Structure primaire de l'ADN

Une fois déroulée, la molécule d'ADN d'une cellule s'étirerait en un fil gigantesque, constitué par un enchaînement précis de caractères dans un alphabet à quatre molécules chimiques symbolisées par les lettres A, T, G et C (représentant les 4 bases azotées de l'ADN: l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G) ou la cytosine (C) (figure 1). Ces caractères forment des mots, les gènes, qui s'enchaînent le long de l'ADN. Chaque maillon ou nucléotide de cette structure est en fait constitué d'un acide phosphorique relié à un sucre (le 2-désoxyribose) sur lequel une des 4 bases azotées est attachée. Les nucléotides sont ensuite reliés entre eux par des ponts phosphodiester impliquant les fonctions hydroxyle des extrémités 3' et 5' des 2-désoxyriboses. C'est la structure primaire de l'ADN. Cette découverte a révolutionné l'étude du vivant, livrant aux biologistes une clé fondamentale pour comprendre la grammaire et le langage des cellules. En effet, c'est précisément dans la molécule d'ADN que sont codées les instructions qui gouvernent le fonctionnement des cellules. On nomme génome l'ensemble des instructions inscrites dans le matériel génétique d'un organisme, codées par l'enchaînement précis des nucléotides.

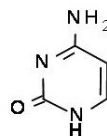
Figure 1: Structure des bases de l'ADN

Bases puriques

Bases pyrimidiques



Cytosine



Thymine



B. Structure secondaire de l'ADN

La molécule d'ADN forme une double hélice dont les montants sont anti-complémentaires. Cette molécule très longue contient chez l'homme environ 3 milliards de paires de nucléotides ou bases. Dix paires de nucléotides forment une spire de 2 nm de diamètre et de 3,4 nm de longueur. L'extension complète de l'ADN humain forme un fil de plus de 1,20 m de long qui tient aisément dans une cellule d'environ 10 µm. Les paires de bases forment des plateaux stabilisés par des liaisons hydrogène entre paires de bases complémentaires. Ces liaisons hydrogène sont spécifiques et concernent respectivement l'appariement non covalent d'une thymine avec une adénine (2 liaisons) d'une part et d'une guanine avec une cytosine (3 liaisons) d'autre part. L'organisation spatiale d'un ADN double brin est une double hélice dans laquelle les bases sont situées à l'intérieur tandis que le squelette sucre phosphate est repoussé à l'extérieur. La rotation entre 2 plateaux consécutifs est de l'ordre de 36°. La compaction extrême de cette molécule (structure en collier de perles dans laquelle l'ADN est pelotonné autour des protéines histones, puis degré de compaction supérieur en chromosome) lui confère entre autre la faculté de stocker de nombreuses informations et de les exprimer ou non selon la phase du cycle cellulaire. Cette faculté de super-enroulement permet de protéger le génome et de le répartir également dans les cellules filles issues des divisions cellulaires successives.

The diagram illustrates the structure of DNA. The left part shows a space-filling model of the DNA double helix, with yellow spheres representing the sugar-phosphate backbone and blue spheres representing the nitrogenous bases. The right part shows a schematic diagram of the DNA double helix, with labels indicating the 20 Å width of the major groove, the 10 Å width of the minor groove, and the 3.4 Å distance between base pairs. Labels include 'PAIRES de BASES', 'squelette poly. desoxyribose. phosphate', and 'axe théorique d'enroulement des deux hélices'.

II. Rôle biologique de l'ADN:

A. La synthèse protéique

Comment le message génétique codé dans cet ADN est-il lu par la cellule? Un messenger intermédiaire est nécessaire : il s'agit de la molécule d'ARN (acide ribonucléique simple brin qui diffère de l'ADN par son sucre - un ribose- et par l'uracile, base s'appariant avec A, et remplaçant la thymine), synthétisée au cours du processus de transcription. Cet ARN permet le transfert de l'information génétique portée par un gène, dans un noyau cellulaire eucaryote, jusqu'au cytoplasme. Pendant le transfert d'information, l'ARN pré messenger est épissé pour donner une succession de séquences codantes (successions d'exons ou ARN messenger mature) ensuite traduites, grâce aux ribosomes et ARN de transfert, sous forme de molécules particulières, les protéines. Celles-ci sont les véritables « ouvrières » de la cellule, bases de l'édifice de la cellule et constituants essentiels du vivant (elles forment les parois, les enzymes, les anticorps, etc.). Chaque gène code, via les codons (ensemble de 3 bases) de ses ARN messagers, une instruction déterminant la synthèse d'une protéine particulière, chargée dans la cellule d'une tâche spécifique (on dit alors qu'un gène "code" pour une protéine donnée). L'épissage alternatif permet la synthèse de plusieurs protéines à partir d'un même gène (un gène code alors pour un ensemble de protéines).

Le nombre d'acides aminés constitutifs de ces protéines est lié à la combinaison des bases simples C, G, A, T ou U. Il existe en théorie 4^3 combinaisons possibles pour définir un acide aminé. Dans la réalité nous n'en décomptons que 20 fondamentaux. Ceci dénote une particularité du code génétique : il est redondant (plusieurs triplets codent pour le même acide aminé) et dégénéré (3ième base du codon dite flottante). Pour exemple, la méthionine (Met) n'est codée que par une seule combinaison de bases ou codon (AUG), alors que l'arginine (Arg) et la leucine (Leu) sont codées par 6 codons (exemple de redondance).

La correspondance standardisée d'un code à 4 lettres en code à 20 acides aminés permet ainsi la synthèse et la fonctionnalité de toutes les protéines susceptibles d'intervenir au sein de la cellule et à l'échelle de l'organisme.

B. La transmission des caractères héréditaires et de l'information génétique

Chaque noyau cellulaire eucaryote contient notre matériel héréditaire entier (l'ADN). Une des singularités de l'ADN est d'être formé de deux brins "complémentaires" et antiparallèles, semblables à une photographie et son négatif. C'est la clé du mécanisme de son dédoublement, ou réplication, qui se produit lors de la division cellulaire. Les deux brins complémentaires se séparent alors, et le négatif de chaque brin est synthétisé, via le processus de réplication. Cette dernière donne lieu à la formation de deux molécules d'ADN strictement identiques à la molécule initiale. Cette réplication a lieu durant la phase S du cycle cellulaire. La réplication de l'ADN est dite semi conservative, la nouvelle molécule contient une moitié de la molécule parentale et une moitié nouvellement synthétisée. La vitesse de réplication de l'ADN dans une cellule eucaryote est d'environ 50 paires de bases à la seconde. Il faut donc plusieurs origines de réplication simultanées pour que la duplication de l'ADN se fasse en un temps raisonnable.

1. Mécanisme de réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN est majoritairement effectuée par des ADN polymérases (α et δ essentiellement), enzymes qui ajoutent des nucléotides au brin nouvellement synthétisé. Elle se sert de l'appariement des bases afin de savoir quels nucléotides doivent être incorporés au brin grandissant en utilisant le brin initial comme support. Cette enzyme catalyse deux réactions principales : la création de ponts hydrogène entre les bases azotées et la formation de liens phosphodiester. De nombreuses autres protéines participent aussi à la réplication de l'ADN ; c'est le cas de l'hélicase, responsable de la création de fourches de réplication, ouvertures créées dans l'ADN double brin afin de permettre à l'ADN polymérase de s'y lier. La réplication de l'ADN implique :

L'orientation d'élongation systématique du nouveau brin dans le sens 5' – 3'

La présence d'une amorce d'ARN créée par l'ARN primase afin d'initier la réplication

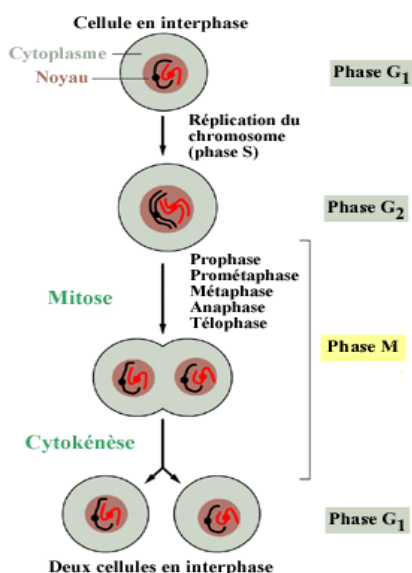
Il est à noter que la synthèse de l'ADN 5'- 3' sur le brin parental 5'- 3' ne peut être effectuée dans le même sens que la réplication globale. Au fur et à mesure que la réplication globale progresse, des amorces d'ARN doivent être synthétisées afin de permettre la réplication du brin retardé dans le sens opposé. Les multiples nouveaux fragments d'ADN obtenus sont appelés

fragments d'Okazaki. Chacun de ces fragments sont reliés par une ADN ligase afin d'obtenir un brin d'ADN intact. Finalement, toutes les amorces d'ARN utilisées au cours de la réplication doivent être remplacées par de l'ADN; cela est effectué par un autre type d'ADN polymérase. À la fin de la réplication, on obtient deux copies identiques d'ADN; chacune contient une moitié de la molécule parentale et une moitié néo synthétisée. Chacune de ces molécules filles se distribue ensuite respectivement dans une des deux cellules issues de la division cellulaire.

2. La division cellulaire

Durant la première phase (phase G_1), la cellule croît et augmente son volume, synthétisant des protéines. Puis elle entre en phase S, durant laquelle l'ADN se réplique. La cellule duplique son matériel génétique et une copie de chacun de ses chromosomes est effectuée. Durant la phase suivante (phase G_2), la cellule vérifie la fidélité de la réplication de l'ADN (réparation post-réplicative) et prépare la division cellulaire. Les chromosomes sont séparés (Mitose) et la cellule se divise en deux cellules filles. A travers ce mécanisme, les deux cellules filles sont dotées des mêmes chromosomes que ceux de la cellule mère. Après la division, les cellules retournent en phase G_1 et le cycle cellulaire s'achève. Chez la plupart des cellules de mammifère, ce cycle cellulaire peut prendre entre 10 et 30 heures. Les cellules en phase G_1 ne poursuivent pas toujours le cycle cellulaire. Elles peuvent quitter le cycle cellulaire et entrer en phase d'attente (phase G_0).

Figure 4: le cycle cellulaire et la division du patrimoine génétique (d'après: http://virologie.free.fr/11-Cycle_cellulaire/images/cycle_cellulaire.gif)

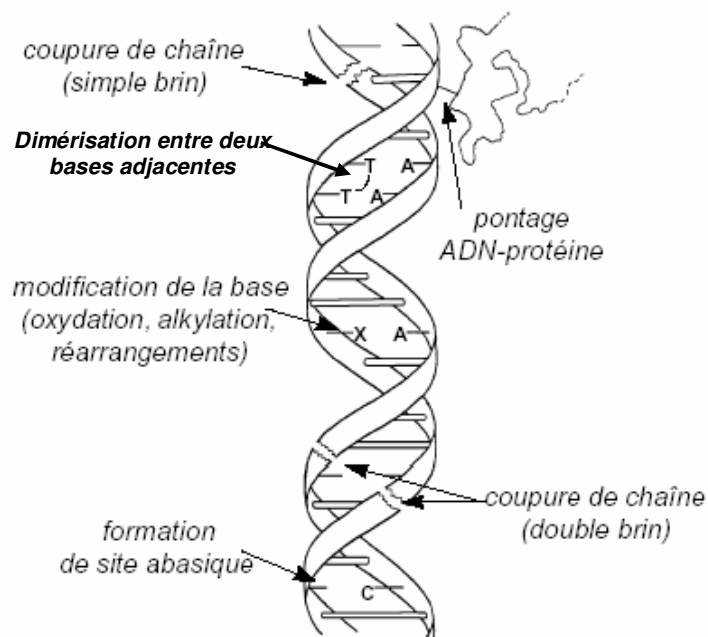


Ces mécanismes fondamentaux, hautement conservés à travers l'évolution sont ubiquitaires chez tous les organismes eucaryotes. La fidélité de la réplication est assurée par des processus enzymatiques complexes, vérifiant la complémentarité des bases (A-T et G-C) et corrigeant les erreurs aléatoires (moins d'une erreur pour un milliard de nucléotides additionnés). Toutefois lorsque la réplication est fautive (erreur d'inversion, de lecture ou ajout de nucléotides excédentaires), une mutation ou erreur génétique a lieu dans la séquence d'ADN. Cette dernière pourra être transmise au cours des générations cellulaires futures.

III. L'ADN : biopolymère cible d'agressions : Les altérations du support de l'information génétique

Ajouté aux altérations dues aux réactions d'oxydation médiées par les espèces réactives de l'oxygène issues du métabolisme cellulaire, un vaste spectre d'agents délétères endommage perpétuellement l'ADN, de manière réversible ou non. On peut noter quatre classes principales de dommages sur la double hélice : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées, les pontages ADN-ADN et ADN/protéines et les sites abasiques (provenant d'une altération première du sucre ou d'une perte de base). La figure ci-dessous illustre ces différents dommages.

Figure 5: les différents types d'altérations de l'ADN (d'après : <http://www-dsv.cea.fr>)



A. Les altérations spontanées

1. La réplication source d'erreurs

La structure primaire de l'ADN peut être altérée par les erreurs générées par les polymérases lors de la réplication. Les mésappariements et les glissements de cadre de lecture d'un brin générant des boucles non appariées sont le défaut des polymérases impliquées dans la réplication. La probabilité d'apparition de ces erreurs est chiffrée à 1 erreur pour 10^8 nucléotides insérés (Loeb & Cheng, 1990); de plus elles sont mutagènes si elles ne sont pas réparées. Aussi, de nombreuses vérifications sont effectuées pendant la réplication. Un système de réparation post-réplication a été développé par les organismes. Chez les bactéries, ce système de correction (Mut) est constitué de 3 protéines : Mut S, Mut L et Mut H. Chez les Eucaryotes ce sont leurs homologues (MSH et MLH) qui sont impliquées dans cette réparation (Kolodner, 1995; Kolodner & Alani, 1994). Chez certaines bactéries notamment *E.coli*, la correction des mésappariements fait intervenir une reconnaissance de la méthylation de certaines bases afin de distinguer brin parental méthylé et brin néo-synthétisé non méthylé. Ainsi repérées, les bases mésappariées sont prises en charge par des enzymes distinctes des polymérases, capables de différencier le brin néo-synthétisé du brin matrice grâce à l'hémi-méthylation de l'ADN parental. Chez d'autres groupes de bactéries, il semblerait que l'activité d'hydrolyse de l'ATP par Mut S soit influencée par sa reconnaissance et sa liaison au mismatch (Drotschmann *et al.*, 2002). Chez les eucaryotes, les modèles actuels mettent en avant la connection entre la machinerie dédiée à la réparation des mésappariements et celle dévolue à la réplication. Toutefois le signal de discrimination des brins n'est pas clairement identifié (Jiricny, 1998).

2. Instabilité chimique des acides nucléiques

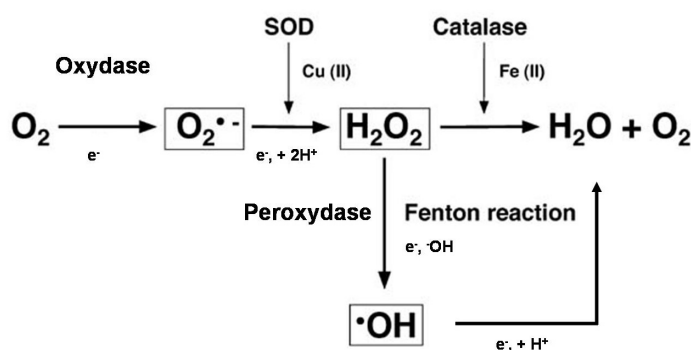
Malgré une relative inertie chimique, les acides nucléiques se décomposent spontanément en solution (Lindahl, 1993). Les amines exocycliques de 3 des 4 bases de l'ADN (Adénine, Guanine et Cytosine) peuvent subir des réactions d'hydrolyse à température et pH physiologiques (Mullaart *et al.*, 1990) à des fréquences toutefois faibles. La cytosine semble être la base la plus sensible à ce processus de désamination spontanée, conduisant à la formation de l'Uracile, base normale de l'ARN, mais erreur au sein de l'ADN. La conséquence de cette hydrolyse est importante puisque les bases ainsi formées sont susceptibles de conduire à des mutations après réplication (à titre d'exemple une transversion de paire de bases C : G vers T : A

peut se produire car la cytosine, après désamination en uracile et après réplication, pourra s'apparier à une adénine comme base complémentaire. Lors de la seconde réplication, la base complémentaire de l'adénine sera la thymine, d'où la notation C : G → T : A).

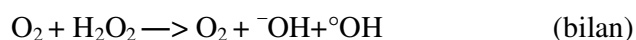
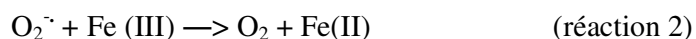
B. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène

Indispensable à la vie aérobie, l'oxygène peut également avoir un effet délétère sur les cellules par la formation d'espèces réactives. Le potentiel extrêmement élevé du couple O_2/H_2O (0,815V) en fait l'agent oxydant le plus réactif au sein de l'organisme. Sa voie de toxicité principale s'exprime notamment lors du métabolisme normal. La transformation de l'oxygène en dérivés plus actifs tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou encore le radical hydroxyle $^{\circ}OH$ proviennent de la réduction partielle de l' O_2 par 1, 2 ou 3 électrons au lieu des 4 nécessaires à la formation de l'eau (Halliwell & Gutteridge, 1984).

Figure 6: cycle du radical $^{\circ}OH$



L'espèce la plus réactive est le radical $^{\circ}OH$. Sa production découle surtout de la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les ions ferreux Fe^{2+} lors de la réaction de Fenton en $^{\circ}OH$ et $^{\cdot}OH$, réaction elle-même alimentée par la génération de l'ion ferreux via le cycle d'Haber-Weiss en présence de fer.



Ces espèces (H_2O_2 ou $O_2^{\cdot-}$) réagissent différemment avec l'ADN, du fait de leur moindre réactivité. Ainsi les radicaux $^{\circ}OH$ les plus réactifs sont capables d'oxyder les bases mais aussi

d'arracher des atomes d'hydrogène aux résidus osidiques, ce qui génère des cassures de chaînes (Cadet *et al.*, 1997).

Au cours de l'évolution, la protection du patrimoine génétique contre l'action des espèces réactives de l'oxygène est devenue une priorité au sein de la cellule. La compartimentation cellulaire liée à la respiration est apparue comme un premier moyen « mécanique » efficace de lutte contre ces ROS. En effet, la respiration cellulaire a lieu dans la mitochondrie et l'ADN, compacté dans le noyau est physiquement protégé des ROS. Ensuite d'autres systèmes plus « chimiques » sont apparus. La neutralisation de l'anion superoxyde (action sélective de la SOD) et du peroxyde d'hydrogène (par la Catalase) dès leur formation au cours du métabolisme normal de la cellule (respiration mitochondriale) permettent l'interception de ces espèces et radicaux potentiellement réactifs et nocifs. Des composés à vertus anti-oxydantes tels que la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (l' α -tocophérol), l'acide urique et les caroténoïdes en sont d'autres exemples actifs.

C. Les méthylations non enzymatiques

Parmi les nombreux agents endogènes susceptibles d'altérer l'ADN, les composés alkylants représentent un groupe d'une grande importance au niveau de leur impact sur les cellules. La S- adénosylméthionine, cofacteur présent lors du transfert enzymatique de groupement méthyle, peut éventuellement alkyliser l'ADN sans contrôle enzymatique. Les résidus puriques sont les principales cibles, conduisant généralement à la formation de 7-méthylguanine et 3-méthyladénine (Ozaki *et al.*, 1993). Cette dernière est fortement cytotoxique en raison de ses propriétés bloquantes de la réplication ; Elle est toutefois réparée par une enzyme : la 3-méthyladénine ADN N-glycosylase. Celle-ci génère un site abasique, ensuite pris en charge par une cascade d'enzymes). En revanche, la 7-méthylguanine est une lésion silencieuse (mêmes propriétés codantes que la guanine) (Saparbaev *et al.*, 2000).

La N-méthyl-N-nitrosourée et la N-éthyl-N-nitrosourée, composés issus de réactions endogènes, sont également responsables de la formation de O⁶-alkylguanines (Swann, 1990), lésions extrêmement mutagènes donnant lieu à des transversions G : C vers T : A. Ce type de lésions est d'ordinaire pris en charge par des alkyltransférases (Guza *et al.*, 2006), présentes chez les Eucaryotes et les Procaryotes. Ces lésions sont toxiques pour la cellules si elles ne sont pas réparées ; elles perturbent en effet le système de réparation des mésappariements, qui fait appel à

l'hémiméthylation de l'ADN pour différencier brin matrice et brin néo synthétisé (Pegg & Byers, 1992).

On peut également ajouter à ces mécanismes, celui engendré par la peroxydation lipidique induite par l'attaque du radical $^{\circ}\text{OH}$ sur un dérivé lipidique. L'oxydation des lipides insaturés constitue une réaction en chaîne aboutissant à la formation d'hydroperoxydes lipidiques peu stables. Ceux-ci se décomposent en deux produits principaux, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-nonén-2-al (4-HNE), tous deux capables de réagir avec les bases aminées de l'ADN et avec les protéines (Blair, 2001; Esterbauer *et al.*, 1991).

D. Les effets du rayonnement solaire

Le rayonnement UV et la lumière visible correspondent à la portion du spectre solaire la plus active vis-à-vis des biomolécules. Les UV sont divisés en 3 composantes : les UV-A (320-400nm), les UV-B (290-320nm) et les UV-C (200-280nm). Après filtration par la couche d'ozone, seuls les UV-A et B parviennent sur terre. Leur activité délétère sur l'ADN s'explique classiquement soit par effet direct (liés aux UV-B), soit par effet indirect (via les UV-A et deux types de mécanismes impliquant des molécules photosensibilisantes).

L'effet direct des photons UV-B sur l'ADN découle des propriétés même de l'ADN. Le pic de la bande d'absorption UV caractéristique de l'ADN se situe à 260 nm. Aussi toutes les bases sont capables d'absorber directement une partie de l'énergie du rayonnement UV-B (290-320nm). Les principales photolésions ainsi formées sont les dimères de type cyclobutane, les adduits de type pyrimidine (6-4) pyrimidone ou encore leurs isomères de valence Dewar (Douki *et al.*, 2000).

L'effet indirect médié par le rayonnement UV-A met en jeu des molécules photosensibilisantes. Les réactions de type I impliquent des réactions d'arrachement d'un électron ou d'un atome d'hydrogène à une molécule cible qui peut être l'ADN, par un photosensibilisateur dans un état triplet excité. Le photosensibilisateur, réduit sous forme de radical anion, peut ensuite réagir avec l'oxygène moléculaire et conduire à la formation du radical anion superoxyde dont la nocivité a déjà été présentée. Les réactions de type II, quant à elles, aboutissent à la formation d'oxygène singulet, réagissant de manière spécifique avec la guanine (Ravanat & Cadet, 1995). Toutefois, l'énergie du photosensibilisateur activé peut aussi être transférée aux bases pyrimidiques, créant un photoproduit.

E. Les radiations ionisantes

Le rayonnement ionisant désigne toute source capable de produire des photons de haute énergie (rayonnements X et γ) ainsi que des particules énergétiques comme des électrons, des protons, des neutrons, des particules α et des ions lourds.

Le rayonnement ionisant peut endommager l'ADN (Ward, 1988) de deux façons distinctes : par effet direct (l'ADN est directement ionisé par le rayonnement) et par l'intermédiaire des espèces réactives formées lors de la dégradation radiolytique du solvant. Dans les cellules, ce rayonnement agit principalement sur l'eau, pour générer, par radiolyse de l'eau, des espèces réactives telles que $^{\circ}\text{OH}$, $^{\circ}\text{H}$, H^+ , e^-_{aq} , H_2 ou encore H_2O_2 . L'importance relative de ces effets indirect/direct varie en fonction de la valeur du Transfert d'Energie Linéique (TEL) (Cadet *et al.*, 2004; Pouget *et al.*, 2002) correspondant à la quantité d'énergie cédée par le rayonnement par unité de distance. Par ailleurs, la formation de sites multi lésés, conséquence de l'action des rayonnements ionisants, augmente avec le TEL (Douki *et al.*, 2006). En effet, la densité d'événements radicalaires et d'excitation multiples augmente avec l'accroissement de la valeur du TEL. Les dommages principaux sur l'ADN sont ici encore majoritairement dus à l'action du radical $^{\circ}\text{OH}$, entraînant de nombreuses altérations mutagènes ou létales (coupures, bases modifiées, lésions doubles...) à proximité du lieu de sa formation.

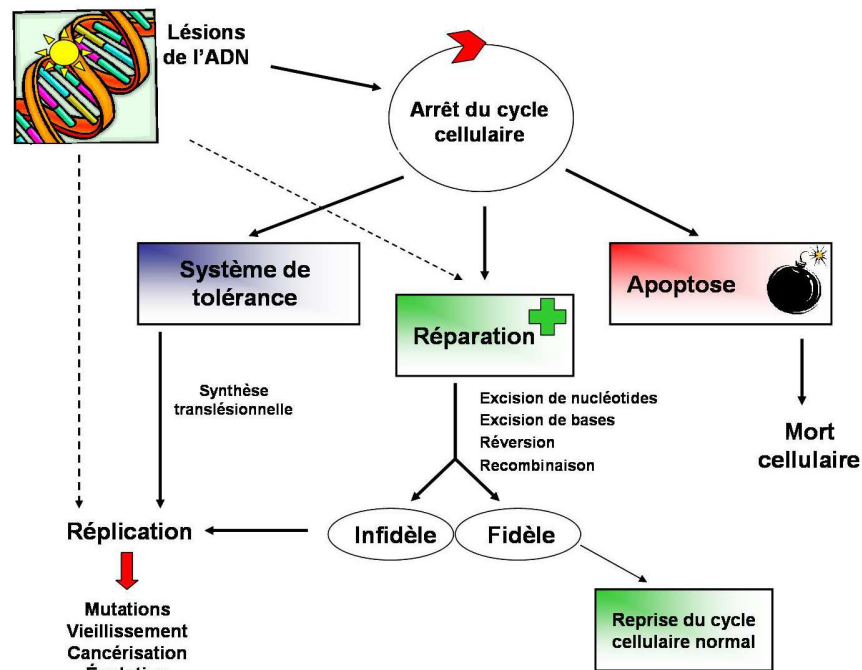
F. Les agents chimiques exogènes

La fumée de cigarettes, un régime alimentaire trop riche en graisses, l'air trop pollué, les traitements de certaines maladies (chimiothérapie) ou encore certains composants d'armes chimiques (gaz moutarde) sont autant de sources diverses et variées d'agents nocifs pour l'intégrité de notre ADN. Parfois précisément désirés (but de la chimiothérapie), ces dommages, principalement des alkylations, impliquent plusieurs sites de l'ADN : positions N-7, O-6 de la guanine et N-3 de l'adénine sont les plus sensibles à ces réactions. Certains agents, possédant deux sites électrophiles, peuvent s'additionner par liaisons covalentes avec l'ADN et conduire à des pontages intra- ou inter-brins. Ces derniers sont fortement létaux pour la cellule par empêchement de l'ouverture de la double hélice lors de la réplication (cis platine, mitomycine C. (Zheng *et al.*, 2003)).

IV. Conséquences biologiques des agressions de l'ADN et réponse mise en œuvre par la cellule

Le maintien de l'intégrité du génome est crucial pour tous les organismes afin de limiter la mutagenèse ou encore la cytotoxicité des altérations induites. Les dommages infligés à l'ADN par les divers agents déjà mentionnés peuvent avoir de sérieuses conséquences s'ils persistent, lorsque les systèmes de réparation sont défaillants. On peut rappeler que plus de 10^4 lésions à l'ADN se créent dans chaque cellule, chaque jour, dues seulement aux erreurs de réplication ou encore au métabolisme cellulaire (Lindahl, 1993) sans compter les nombreuses altérations engendrées par les composés chimiques environnementaux, les fumées de cigarettes, ainsi que les radiations et rayonnements solaires auxquels sont exposés certains d'entre nous. Ces dommages induisent un certain nombre de réponses au sein de la cellule, étroitement liées et hautement coordonnées avec les processus de réparation des sites lésés (Figure 7 : réaction de la cellule devant des lésions).

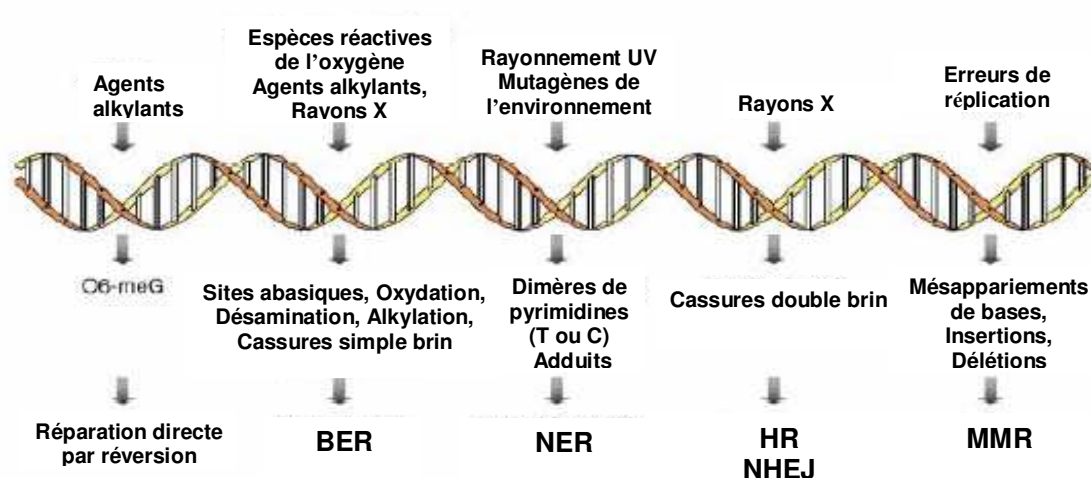
Figure 7: Réactions de la cellule devant des lésions



On peut rappeler également que le niveau de dommages de l'ADN susceptible d'induire des cancers est relativement faible ; ceci explique pourquoi les systèmes de réparations des dommages de l'ADN doivent être efficaces et spécifiques pour contrecarrer cette menace.

Parmi tous ces systèmes de réponse à l'endommagement du génome, l'organisme s'adapte afin que ces lésions soient efficacement détectées. Selon leur nature et leur abondance, elles peuvent être létales (mise en route de la mort cellulaire programmée par apoptose) ou tolérées (les mutations induites pouvant être muettes, létales ou tout simplement favoriser l'évolution) ou bien encore prises en charge par un système intégré hautement coordonné afin de les réparer. Selon le type de lésions, son origine et son encombrement, plusieurs systèmes de réparation sont alternativement recrutés (cf. Figure 8).

Figure 8: Les différentes voies de réparation de l'ADN d'après (Scharer, 2003)



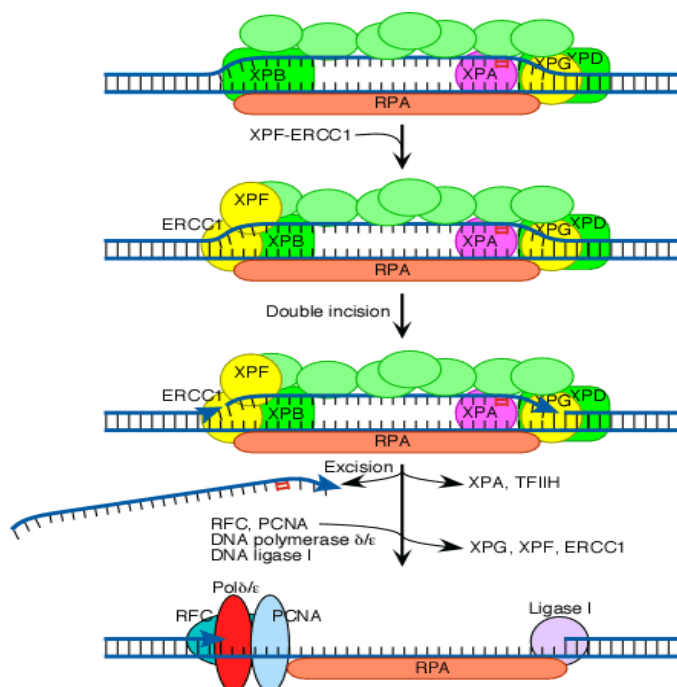
A. La réparation par Excision de Nucléotides (NER)

Cette voie de réparation des dommages de l'ADN concerne des lésions volumineuses, notamment les principaux photoproduits des rayonnements UV (dimères de pyrimidines de type cyclobutane, adduits pyrimidine (6-4) pyrimidone) ou encore les adduits issus de l'action de nombreux agents mutagènes ou encore d'agents utilisés en chimiothérapies (cisplatine, psoralènes). Bien qu'un des rôles du NER soit la prise en charge de dommages UV induits, il permet toutefois à un organisme de faire face de façon efficace à toute une gamme de dommages, générés par des agents délétères et possède de ce fait une large spécificité de substrats. L'efficacité de cette voie de réparation semble corrélée au degré de distorsion de l'hélice d'ADN. En effet, les mésappariements (mismatches) ne semblent pas induire de distorsion majeure sur l'ADN, ce qui ne leur permet pas d'être substrat pour une réparation par

le NER. Ces lésions sont prises en charges par d'autres systèmes de réparation (Sancar, 1996; Scharer, 2003).

L'étude des mécanismes de réparation par excision de nucléotides a fait l'objet de nombreux travaux de recherche qui ont conduit à en identifier les différentes étapes : la reconnaissance de la lésion, une double incision du brin endommagé en 5' et 3' de la lésion, libérant un oligonucléotide (de 24 à 32 bases chez les eucaryotes ; de 13-15 bases chez les Procaryotes) contenant la base endommagée et enfin, la réparation par re-synthèse et ligation du brin néo-synthétisé. Plus de 30 protéines sont impliquées dans cette voie de réparation chez les Mammifères, certaines participant activement au recrutement des autres avec un enchaînement précis ; parmi ces protéines, on peut citer les protéines du groupe XP, mais aussi TFIIH, ERCC1 justement responsable du clivage du nucléotide contenant la lésion ou encore la protéine PCNA (Bohr *et al.*, 1985; Christmann *et al.*, 2003; Hanawalt, 2001; Mellon *et al.*, 1987). Toutefois, il reste encore des aspects mécanistiques à élucider. Il a aussi été démontré l'existence et l'importance d'autres systèmes de réparation contribuant au maintien de l'intégrité génomique, notamment ceux concernant la réparation de lésions par le système de réparation couplée à la transcription, actif sur le brin transcrit (TCR) (Hanawalt, 1987; Mellon *et al.*, 1986; Smith, 1987).

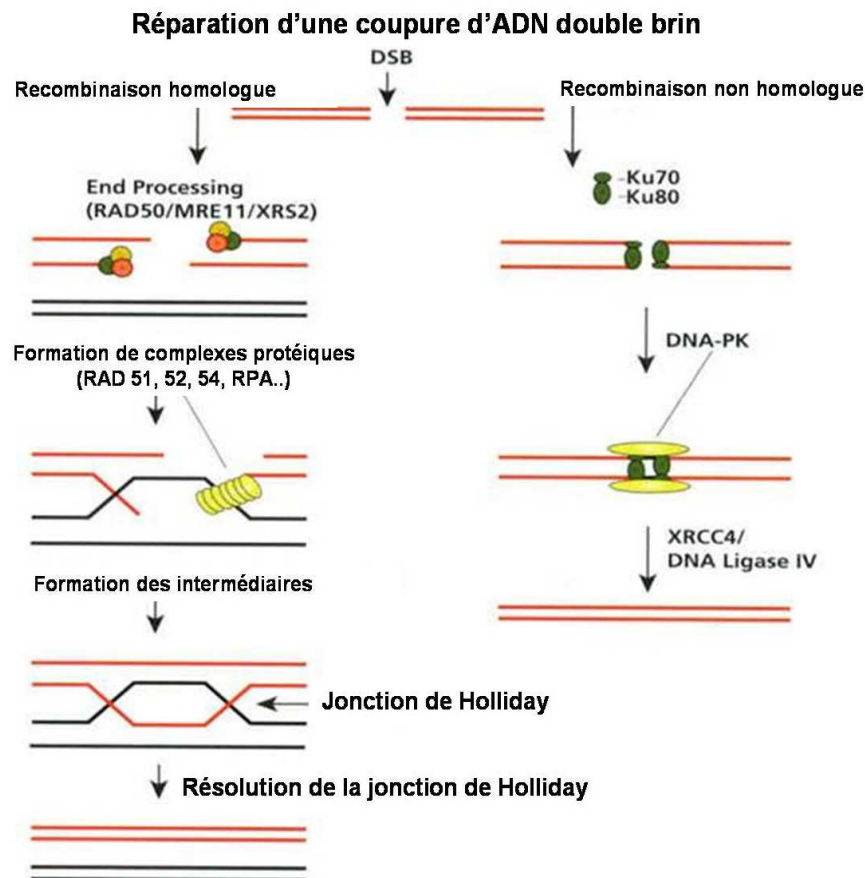
Figure 9: la réparation des dommages de l'ADN par la voie d'excision de nucléotides (source Internet http://saturn.roswellpark.org/cmb/huberman/DNA_Repair/ner.html)



B. La réparation des cassures doubles brins

Les cassures double brin, fortement délétères, sont préférentiellement engendrées par les radiations ionisantes ainsi qu'une sous-classe de lésions multiples. Deux voies de réparations ont émergé pour prendre en charge ces lésions hautement létales. La réparation par recombinaison homologue (Cromie *et al.*, 2001) utilise l'information codante portée par la chromatide sœur de la partie endommagée. Une seconde voie de réparation, le réparation par recombinaison non homologue ou NHEJ (Non Homologous End-Joining repair), consiste à rejoinde les fragments cassés d'ADN (Haber, 2000; Jeggo, 1998); toutefois, elle ne constitue pas une voie de réparation fidèle, puisque des délétions de quelques nucléotides peuvent avoir lieu lors du processus.

Figure 10: recombinaison homologue et non homologue d'après (Scharer, 2003)



C. La réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des bases mésappariées a lieu principalement lors des phénomènes de réplication de l'ADN. Elle implique la reconnaissance des brins parentaux ou néo-synthétisés. En effet, chez *E.coli*, la discrimination des deux brins pour la réparation est rendue possible par la méthylation de séquences spécifiques des brins parentaux uniquement. La réparation s'effectue sur les brins fils, avant leurs propres méthylation par les méthyltransférases. La reconstitution *in vitro* chez *E.coli* a conduit à l'identification des protéines impliquées (Lahue *et al.*, 1989). Parmi elles, on peut citer Mut S (qui s'apparie dans la zone mésappariée) ; Mut L et Mut H agissent de façon synergistique pour enlever la zone portant la séquence erronée sur le brin non méthylé ainsi que de nombreuses hélicases, polymérases et ligases. Chez les eucaryotes, on retrouve des homologues de Mut S (MSH 2,3 et 6) ainsi que Mut L (MLH 1, 3 et PMS2). Les interactions protéiques semblent un peu plus complexes que chez les bactéries, et le système de re-synthèse d'ADN est pris en charge par la machinerie de réplication des cellules.

Il a été mis en évidence l'implication d'une déficience de cette voie de réparation dans l'étiologie de cancers héréditaires (HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) (Jiricny & Nystrom-Lahti, 2000), d'où l'intérêt d'une étude approfondie des mécanismes sous-jacents de cette voie de réparation ainsi que la recherche de corrélations possibles entre l'apparition de mutations dans des gènes du MMR et l'induction de cancers (Aaltonen *et al.*, 1993).

D. La réparation par réversion (RR)

1. Les différentes enzymes impliquées

La plupart des mécanismes de réparation font appel à la complémentarité du brin non endommagé pour restaurer l'intégrité de l'information génétique. On peut ajouter que de nombreuses protéines sont impliquées dans ces processus. Toutefois, il existe également une voie de réparation directe des dommages.

Les dommages induits par les UV de type photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone ou encore les cyclobutadipyrimidines sont par exemple pris en charge chez les bactéries par les photolyases, grâce au processus de photoréactivation (Sinha & Hader, 2002). Ce dernier implique les photons lumineux pour reconvertir les dimères de pyrimidines en monomères (Thompson & Sancar, 2002). Les lésions du type O⁶-alkylguanine sont réparées par les O⁶-

alkylguanine transférases (AGT) respectivement chez les bactéries et les eucaryotes inférieurs (Labahn *et al.*, 1996). Chez les mammifères, seules les bases O⁶-methylguanine sont réparées ainsi par la O⁶-methylguanine-DNA-methyl-transférase (MGMT).

La réparation par l'AGT se fait en une seule étape par transfert du résidu méthyle sur une cystéine de l'enzyme, de façon covalente, qui de ce fait inhibe définitivement l'enzyme. C'est une « enzyme-suicide » qui restaure donc la structure normale de la guanine en cas d'alkylation et qui est ensuite dégradée par protéolyse.

2. Les glycosylases et la réparation des bases alkylées

D'autres glycosylases ont été isolées et caractérisées chez les levures (enzyme MAG chez *S.Cerevisiae* (Berdal *et al.*, 1990)), les mammifères telle que la 3-Methyl-Adénine DNA Glycosylase, encore appelée MPG, AAG ou ANPG (O'Connor & Laval, 1991). Elle possède une plus large spécificité de substrat, incluant les purines alkylées, les éthénobases (la 1-N⁶-éthénoadénine par exemple) ainsi que l'hypoxanthine (Clarke *et al.*, 1984; Nakabeppu *et al.*, 1984a; Nakabeppu *et al.*, 1984b; Seeberg *et al.*, 1995; Steinum & Seeberg, 1986). Elle partage cette spécificité de substrats avec son homologue bactérien AlkA, bien que leur séquence d'acides aminés diffère (homologues fonctionnels au même titre que hOGG1 et Mut M/Fpg). Les adduits alkylés peuvent aussi être directement éliminés par l'enzyme Alk B (enzyme bactérien équivalents de hABH₂ et hABH₃ chez l'homme), capable de réparer les 1-méthyle adénine et 3-méthyle cytosine (Drablos *et al.*, 2004). Le processus est un peu complexe car l'enzyme possède comme cofacteur l'acide cétooglutarique. Ce dernier subit une réaction de décarboxylation oxydative, en présence de Fe (II) et d'oxygène, utile à l'hydroxylation concomitante de la base méthylée (Falnes *et al.*, 2002).

3. Les enzymes de réparation par réversion et le développement des traitements anticancéreux : inhibition enzymatique volontaire

De nombreuses thérapeutiques anticancéreuses reposent sur l'alkylation massive des bases de l'ADN dans les cellules tumorales. Toutefois, si le processus de réparation par réversion est suffisamment efficace, toutes les lésions créées sont réparées et le traitement demeure inefficace. Le développement de nouvelles approches thérapeutiques repose aujourd'hui sur l'inhibition spécifique d'alkyle transférases, pour permettre à la cellule de rentrer en apoptose lorsqu'elle détecte un taux de sites AP trop important. Ceci permet de diminuer les doses d'agents alkylants,

qui sont souvent responsables d'effets secondaires difficiles à supporter (Dolan *et al.*, 1990; Dolan & Pegg, 1997). D'autres alternatives consistent par exemple à surexprimer ces mêmes enzymes dans des compartiments cellulaires précis afin de créer un déséquilibre volontaire dans la réparation et initier artificiellement le processus d'apoptose lors du traitement par des agents alkylants (Fishel *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002). D'autres possibilités impliquent le ciblage d'agents anticancéreux, ayant une action sur les sites abasiques générés au cours de la réparation, bloquant ainsi le processus de BER et augmentant l'efficacité thérapeutique des traitements alkylants (Ide & Kotera, 2004; Wilstermann & Osheroff, 2001).

Il apparaît nécessaire de pouvoir vérifier les capacités de réparation des dommages de la cellule, de manière à pouvoir intervenir si possible en amont de l'apparition des premiers symptômes des pathologies mentionnées. Ceci peut se traduire soit par inhibition soit par stimulation spécifiques des voies de réparation (ex : traitements anticancéreux). L'analyse des cinétiques de réparation enzymatique pourra ainsi être utilisée pour le pronostic médical. En effet, une analyse des activités de réparation en amont du traitement permettrait une adaptation individuelle des doses afin de limiter les effets secondaires ou des réactions d'hypersensibilité. Toutefois, les méthodes actuelles de suivi de réparation n'autorisent qu'une analyse *in vitro* et leur application relève préférentiellement du domaine de la recherche fondamentale.

E. La réparation par Excision de Bases (BER)

1. Généralités

Les altérations peu volumineuses de l'ADN n'entraînant pas de distorsion majeure de l'hélice comme c'est le cas des lésions résultant de la désamination, l'oxydation ou encore l'alkylation de bases, sont principalement réparées par le système de réparation par excision de bases ou « Base Excision Repair » (BER).

Le BER fut découvert par Lindahl en 1974 lors de ses recherches sur une enzyme capable de prendre en charge et d'exciser un résidu désaminé de cytosine, l'uracile (Lindahl, 1974). Il caractérisa ainsi l'Uracile DNA glycosylase, enzyme capable de libérer la base endommagée, à savoir l'uracile. Cette découverte ouvrit des champs de recherche très active sur ces « nouvelles » enzymes. Le BER est initié par les ADN *N*-glycosylases, enzymes qui reconnaissent le dommage au sein de l'ADN et hydrolysent leur liaison *N*-glycosidique entre la base et le résidu 2-désoxyribose, afin de générer un site abasique. Parmi les nombreuses familles de glycosylases (mammifères ou bactériennes) identifiées à ce jour, qui montrent différentes

spécificités de substrat, (cf. Figure 11) nous ne détaillerons que celles dont l'activité de réparation sera utile à nos travaux.

Figure 11: les différentes glycosylases impliquées dans le BER d'après (Slupphaug *et al.*, 2003)

Mammalian DNA glycosylases ^a				
Name	Size (aa)	Lyase activity	Cellular localisation	Known substrates ^b
hUNG1	304	No	Mitochondria	ssU > U:G > U:A > 5-FU (poor: 5-OHU, isodialuric acid, alloxan) [97,130,131]
hUNG2	313	No	Nuclei	ssU > U:G > U:A > 5-FU (poor: 5-OHU, isodialuric acid, alloxan) [97,130,131]
mUNG1	295	No	Mitochondria	U, 5-FU
mUNG2	306	No	Nuclei	U, 5-FU
hSMUG1	270	No	Nuclei	ssU > U:G > ss5-HMU > 5-HMU:G > U:A > 5-HMU:A > εC:G > 5-FU:A [95,97]
hTDG	410	No	Nuclei	U:G > εC:G > T:G [132–134]
hMBD4	580	No	–	U/TpG:5-meCpG, U/T:G, 5-HMU:G, foU:G, 5meC, 5-FU:G [135–138]
hUDG2	327	No	–	U:A [139]
hMPG	293	No	–	3-meA, 7-meA, 3-meG, εA, HX, 7-meG, 8-oxoG, εG [140,141]
mMPG	–	No	–	3-meA, 7-meA, 3-meG [142]
hOGG1 ^c	345	Yes	Nuclei (α)	me-FaPyG:C > FaPyG:C > 8-oxoG:C > 8-oxoG:T [143]
	424	Yes	Mitochondria (β)	8-oxoG:C
mOGG1	345	Yes	–	8-oxoG:C >> 8-oxoG:T > 8-oxoG:G [144]
hOGG2		Yes	Nuclei?	8-oxoG:G, 8-oxoG:A [75]
hNEIL1	391	Yes	Nuclei	8-oxoG:C > 8-oxoG:G > 8-oxoG:T, Tg, 5-OHC, 5,6-DHU, FaPyA, FaPyG [69–72]
mNEIL1			Nuclei	Tg:G/C/T > TgA = ssTg > U:C = T:C > 8-oxoG:A/C ≈ U/T:G/T > ssU [70]
hNEIL2	333		Nuclei (+mitochondria?)	5-OHU, 5,6-DHU, 5-OHC [73]
hMYH ^d	521	No	Mitochondria	A:G, A:8-oxoG > 2-OH-A:G >> C:A
	535	No	Nuclei	A:G, A:8-oxoG > 2-OH-A:G >> C:A [78]
hNTH1	312 (304)	Yes	Nuclei (+mitochondria?)	5-OHC, Tg:A > Tg:G, 5-OHU, 5,6-DHU, FapyG:A/G/T, 5-föU [91,145,146]
mNTH1	300	Yes	–	Tg:A ≈ FapyG:A/G/C/T, urea [147]
Putative new DNA glycosylases				
hNEIL3	606		Nuclei	Activity not verified in recombinant enzyme [70–72]
mTGG1	–	No	Mitochondria	Monofunctional glycosylase against Tg partially purified from mice [148]

^a h: human; m: mouse.

^b In mismatches, the target base is at the left.

^c Thirteen alternative OGG1 transcripts and two major protein forms (α and β) have been demonstrated only α encodes a NLS.

^d Ten alternative hMYH transcripts have been demonstrated.

2. Mécanismes d'action des glycosylases

Il existe deux mécanismes d'action possibles pour les ADN *N*-glycosylases.

Les ADN *N*-glycosylases monofonctionnelles font appel à une molécule d'eau comme nucléophile pour cliver le lien *N*-glycosidique et générer le site abasique. Leur seule fonction est la création du site abasique pour que celui-ci soit pris en charge par d'autres enzymes complémentaires. Dans les cellules de mammifères, une AP-endonucléase (apurique-apyrimidinique), APE 1 (encore appelée HAP-1 ou Ref-1) hydrolyse ensuite le lien

phosphodiester en 5' du site abasique afin de générer un trou d'un seul nucléotide manquant (Kubota *et al.*, 1996).

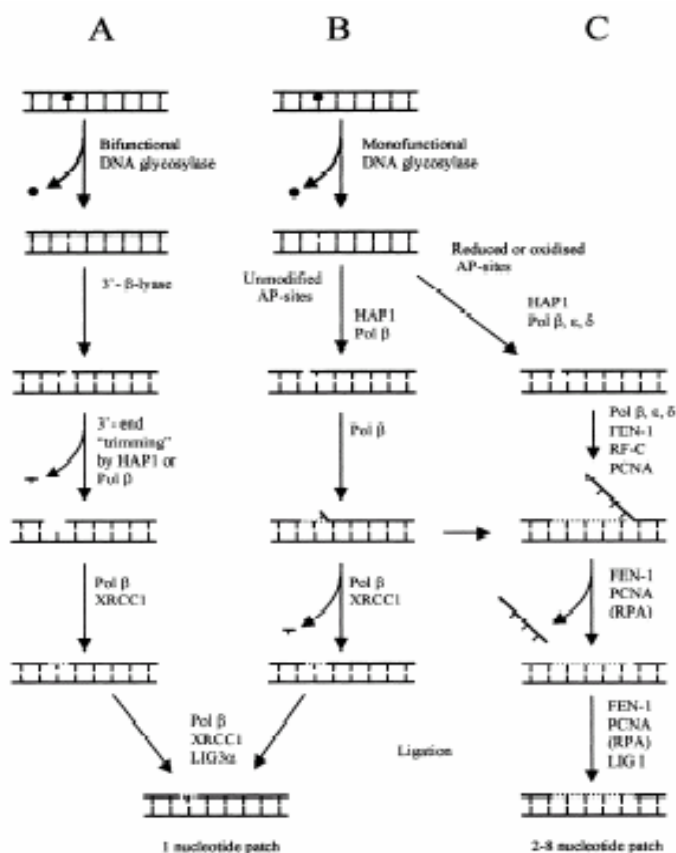
Les ADN *N*-glycosylases bifonctionnelles/AP lyases, font intervenir un résidu aminé de l'enzyme comme nucléophile pour générer un intermédiaire : une base de Schiff. Après son élimination par une réaction de β élimination, la liaison phosphodiester en 3' est rompue. Ces enzymes spécifiques peuvent donc générer la coupure du squelette pentose phosphate après création du site abasique. OGG1, NTH1 et NEI1 sont, chez les mammifères, les seules glycosylases qui possèdent cette activité AP lyase. Fpg, homologue de OGG1 chez la bactérie est également considérée comme une glycosylase bifonctionnelle (β - δ élimination) (Graves *et al.*, 1992). APE 1 hydrolyse ensuite le lien phosphodiester en 3' du sucre afin de générer un trou d'un seul nucléotide manquant

Dans la voie classique du mécanisme BER, c'est-à-dire la réparation par brèche courte ou « short patch repair », la polymérase β réintroduit le nucléotide manquant et la ligation s'effectue par l'activité de la ligase III. La protéine XRCC1 (X Ray Cross Complementation Protein 1) se fixe sur le site lésé et potentialise ces différentes activités (Campalans *et al.*, 2005; Marsin *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2001a). Les ADN *N*-glycosylases montrent une grande affinité pour leurs produits de réaction, à savoir les sites abasiques, et demeurent probablement liés à ces derniers jusqu'à l'intervention de APE-1 ; celle-ci agit directement avec Pol β et XRCC1, puis Pol β interagit avec la ligase III via XRCC1. Alors que le complexe formé par XRCC1 et la ligase III est constitutif, les interactions entre les autres protéines semblent être de nature temporaire (Matsumoto *et al.*, 1994).

Une deuxième voie du mécanisme BER est celle de la réparation via une brèche longue ou « long patch repair », qui se traduit par le remplacement de fragments plus longs, comptant de 2 à 10 nucléotides. Elle implique la polymérase δ ou ϵ chez les eucaryotes ainsi que d'autres protéines, différent de celles requises dans « le short patch repair » (Fen - 1, ligase I...). Chez les mammifères, cette voie de réparation concerne des sites apuriques-apyrimidiniques oxydés ou réduits alors que les sites apuriques-apyrimidiniques sont normalement pris en charge par le « short patch repair » (Barzilay & Hickson, 1995).

Quelque soit la voie considérée, le processus d'excision-resynthèse est coordonné de façon rigoureuse pour assurer une réparation sécurisée des sites abasiques et des cassures de brins, eux-mêmes extrêmement toxiques pour les cellules.

Figure 12: le BER d'après (Krokan *et al.*, 2000)



Il existe des caractéristiques communes concernant le mécanisme d'action de ces enzymes sur leur lésion. La réparation est conditionnée par l'extrusion du nucléotide modifié hors de la double hélice d'ADN, en direction du site actif de la glycosylases, où se déroule la catalyse enzymatique. Cette extrusion représente une voie ingénieuse pour les enzymes impliquées dans les réactions de reconnaissance de modifications sur l'ADN d'ordinaire dissimulées –donc inaccessibles- dans le grand ou petit sillon de l'ADN. L'extrusion du nucléotide cible (« Pull ») implique la distorsion locale de l'hélice d'ADN (« Pinch ») et s'accompagne d'une rotation autour des liaisons phosphodiesteres flanquant ce nucléotide cible (« Push ») (David & Williams, 1998).

V. Les principales ADN *N*-glycosylases intervenant dans la Réparation par Excision de Bases.

Comme précédemment mentionné, il existe de nombreuses familles de glycosylases, identifiées selon leur spécificité d'action. Malgré leurs caractéristiques fonctionnelles communes, certaines se singularisent par leur cinétique d'excision plus ou moins rapide, ou encore leur spécificité de substrats plus ou moins étendue. Nous ne nous intéresserons ici qu'à celles utilisées dans les expériences décrites dans la seconde partie de ce manuscrit.

A. L'UNG et la réparation de l'uracile dans l'ADN

Parmi ces enzymes, il convient de souligner les particularités de l'UNG (« Uracil DNA *N*-Glycosylase »). L'UNG prend en charge les résidus uracile contenus par erreur dans l'hélice d'ADN. La présence d'uracile dans l'ADN peut provenir de l'incorporation malencontreuse de 2'-désoxyuridine pendant la réplication de l'ADN, lorsque, par exemple, la dUTPase cellulaire n'a pas éradiqué ces résidus du stock de dUTP (pour la synthèse endogène /de novo de dTMP ; (Parikh *et al.*, 2000a)). Toutefois, la source majeure d'uracile dans l'ADN provient de la désamination spontanée de la cytosine par hydrolyse (Lindahl & Nyberg, 1974; Shapiro & Klein, 1966). La désamination spontanée de la cytosine en uracile conduit à la formation de paire de bases G:U qui, si elles ne sont pas réparées, conduiront à des transversions G:C vers A:T. La désamination de la cytosine peut également être le fait de la cytosine désaminase, enzyme exprimée dans les lymphocytes ou encore codée par les virus comme l'EBV (Epstein Barr Virus, ou virus de la mononucléose infectieuse). Dans les deux cas, la formation d'uracile dans l'ADN puis sa réparation entraîne une hypermutagénicité des gènes des immunoglobulines ou du virus (Shen *et al.*, 2005).

L'UNG est une enzyme commune à des familles virales (Pox et virus de l'Herpes) comme aux organismes procaryotes et eucaryotes. Le gène de cette enzyme est situé, chez l'homme sur le chromosome 12q24.1 ; il contient 7 exons et code pour deux isoformes, UNG1 (304 acides aminés) et UNG2 (313 acides aminés) à localisation respectivement mitochondriale et nucléaire (Krokan *et al.*, 2000). De plus, la haute conservation du gène de l'enzyme à travers l'évolution indique une similarité dans la structure du site actif, ainsi que dans le mécanisme d'action (Parikh *et al.*, 2000b). Elle se présente sous forme de 4 feuillets β entourés de 8 hélices α . (Parikh *et al.*, 2000a). Le feuillet β 2 est responsable de la reconnaissance de l'uracile et des

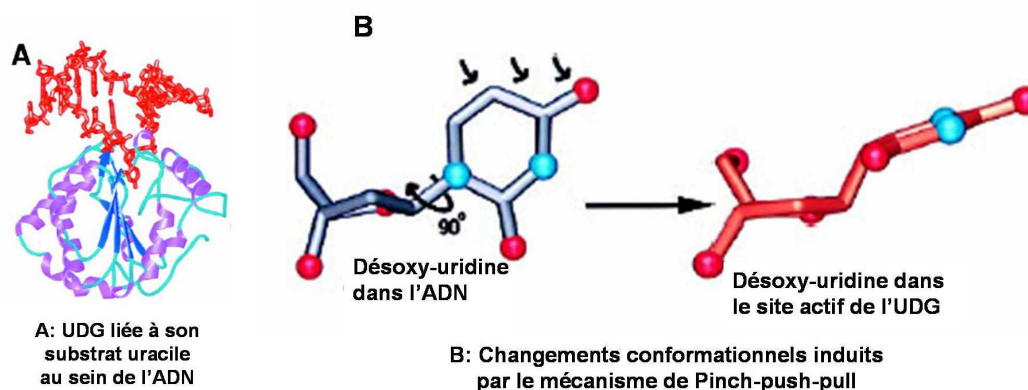
boucles riches en proline, lysine et sérine qui facilitent les interactions entre la protéine et l'ADN.

L'UNG élimine de façon spécifique les résidus uracile contenus dans une structure d'ADN simple brin *in vitro*, et plus probablement les motifs uracile faisant face à une base G ou A dans un ADN double brin. Elle n'est évidemment pas active contre l'uracile contenu dans l'ARN, ni contre les mononucléotides et les nucléosides correspondants. La reconnaissance efficace de l'uracile présente dans l'ADN par l'UNG semble requérir le contact de l'enzyme avec le maillon pentose phosphate, d'abord de façon non spécifique (recherche de la lésion) puis induit des distorsions de l'ADN plus prononcées au niveau du résidu uracile ainsi détecté (Singh *et al.*, 1994).

Figure 13: L'UNG et structure aux rayons X

A : Structure cristallographique de l'UNG liée à l'ADN ;

B : Distorsion de l'ADN au niveau de l'uracile dans le site actif de l'enzyme



Cette capacité de l'UNG à pouvoir reconnaître l'uracile dans les deux types de structure, simple ou double brin, la place en marge des autres enzymes, qui sont exclusivement actives sur des structures double brin. En effet, cette enzyme possède la capacité de discriminer les résidus thymine, pourtant proches structuralement de l'uracile, et de les exclure de l'éventail de lésions excisées par l'enzyme, tout en reconnaissant l'uracile de façon hautement spécifique et efficace. Les structures résolues par rayons X de l'enzyme sous forme de complexe avec un brin d'ADN contenant un résidu uracile ont confirmé l'hypothèse sous jacente : l'enzyme contient une poche exclusivement dévolue à la reconnaissance spécifique de l'uracile, assurant ainsi une reconnaissance spécifique du substrat. En revanche, il ne paraît exister aucun effet de séquence pour l'excision de l'uracile sur une séquence simple brin, ce qui souligne l'importance d'une dénaturation locale de la structure autour de l'uracile pour une reconnaissance et une excision maximale ou optimale.

Parmi les substrats de cette enzyme, on peut citer l'analogue nucléosidique anticancéreux 5-fluorouracile (5-FU), excisé par l'UNG mais de façon plus lente que l'uracile. L'UNG humaine semble afficher une certaine affinité pour les substrats dérivés de l'uracile, issus de dommages induits de manière oxydative sur la cytosine après irradiation γ tels que la 5-hydroxyuracile, l'acide isodialurique ou encore l'alloxane, excisés toutefois moins rapidement que l'uracile (David & Williams, 1998). Ces résultats tendent à suggérer une implication de l'UNG dans la réparation de plusieurs bases oxydées de l'ADN.

L'UNG peut être inhibée par de petites protéines monomériques, thermostables et de petite taille (84 acides aminés pour un poids moléculaire de 9,4 kDa) : UGi : inhibiteurs de l'UNG. Ces protéines forment un complexe avec l'UNG dans un rapport stoechiométrique 1 :1 et la liaison irréversible ainsi formée n'est déplacée ni par ajout de UGi libre ni par la chaleur. Seul un traitement au SDS ou à l'urée 8 M permet de la rompre (Acharya *et al.*, 2002).

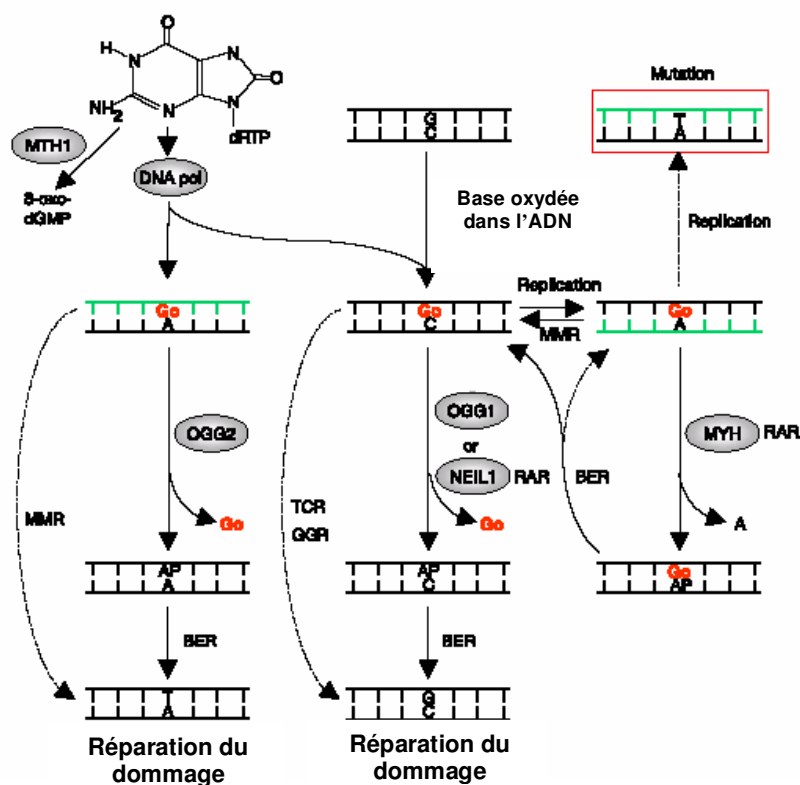
L'UNG n'est pas le seul système de réparation de l'uracile dans l'ADN. D'autres familles enzymatiques montrent également cette fonction et sont toutes parentes entre elles. Elles dérivent en effet du même gène codant pour les protéines excisant l'uracile. Parmi ces familles, on peut citer la « thymine/uracil mismatch glycosylase », la famille contenant les MUG glycosylases (homologue bactérien des TDG), MBD₄ ou encore les UNG thermostables. Les spectres d'activité diffèrent légèrement entre ces familles, mais restent néanmoins assez proches (Krokan *et al.*, 2000; McTigue *et al.*, 2004). Des variations sont à noter au niveau des activités catalytiques, qui sont fortement amoindries chez les familles MUG et TDG humaines en comparaison avec leurs homologues bactériens.

B. La réparation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine par le système OG

La 8-oxo-7,8-dihydroguanine compte parmi les lésions de l'ADN les plus étudiées. En effet, le potentiel d'oxydation de la guanine étant les plus bas parmi les autres constituants de l'ADN ($\approx 1,29$ V contre des potentiels $> 1,4$ V pour les trois autres bases de l'ADN), ceci en fait une cible privilégiée pour les réactions d'oxydation à 1 électron qui conduisent préférentiellement à la formation de 8-oxo-7,8-dihydroguanine. Cependant la formation de 8-oxo-7,8-dihydroguanine est une étape assez ubiquitaire après un stress. Cette base oxydée apparaît être un biomarqueur ubiquitaire de nombreux agents du stress oxydant. La réparation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine,

lésion potentiellement très mutagène, fait appel à plusieurs mécanismes très coordonnés. En effet, la 8-oxo-7,8-dihydroguanine peut être appariée avec une cytosine. Une première enzyme entre en jeu pour réparer la lésion : chez la bactérie, c'est Mut M (Fpg) et chez les eucaryotes, OGG. Si la lésion demeure au sein du génome, et après réplication, elle peut être appariée à une adénine. La prise en charge du mésappariement se fait d'abord par élimination de l'adénine par Mut Y chez la bactérie ou par son homologue mammifère MYH, et le système Mut M/OGG termine ensuite le processus. Enfin l'incorporation de 8-oxo-7,8-dihydroguanine dans l'ADN peut provenir de l'incorporation de 8oxodGTP (issus de l'oxydation cellulaire des dGTP) dans le pool des nucléosides triphosphates. Un système cohérent et complémentaire assure enfin l'intégrité du pool de dGTP (par Mut T chez la bactérie chez ou MHT chez l'homme). Le mécanisme implique une hydrolyse en nucléosides monophosphate grâce à une activité pyrophosphate hydrolasique (Mitra *et al.*, 2002). Il est donc nécessaire d'avoir à disposition un système concerté d'enzymes de réparation, ayant chacune une tâche bien définie pour assurer le maintien de l'intégrité du génome. C'est le système OG (ou GO).

Figure 14: : le système OG



1. Réparation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine appariée à une cytosine

a Le système Procaryote : La Formamidopyrimidine glycosylase Fpg (Mut M)

La Fpg, enzyme de poids moléculaire de 30,2 kDa dont le gène a été cloné (Boiteux *et al.*, 1987), contient 263 acides aminés qui forment entre autres 4 motifs en doigts de « cystéine-zinc ». Ceux-ci sont essentiels à la fixation de l'enzyme sur l'ADN et à son activité enzymatique. Elle appartient à la superfamille de glycosylases contenant un motif HhH : « Hélice-boucle-hélice », de même que des enzymes comme NEIL1 ou Endonucléase VIII (Izumi *et al.*, 2003). Son site actif se situe entre l'acide aminé 73 et l'extrémité N terminale sur laquelle un résidu proline joue le rôle catalytique nucléophile (Dizdaroglu, 2003; Fromme *et al.*, 2004b; Tchou & Grollman, 1995; Zharkov *et al.*, 2003). Outre son activité N-glycosylase, Fpg possède une activité AP lyase sur les sites abasiques faisant intervenir un mécanisme de β - δ -élimination, laissant les extrémités 3' et 5' de l'ADN phosphorylées (Bailly *et al.*, 1989).

Les substrats de cette enzyme sont très variés (David & Williams, 1998) : outre la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, Fpg excise efficacement les résidus Fapy-guanine (lésions qui résulte de l'ouverture du cycle imidazole de la guanine après une étape d'oxydation de la base purique), les Fapy-adénine ou encore la 5-hydroxycytosine (5-OH-Cyt) et la 5-hydroxyuracile (5-OH-Ura), ainsi que d'autres bases oxydées dont les diols de thymine, l'alloxane... (Dizdaroglu, 2003).

b Le système eucaryote et la 8-oxo-7,8-dihydroguanine glycosylase 1 : l'enzyme OGG1

Un gène localisé sur le chromosome XIII de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* fut identifié et nommé OGG1 (de Oliveira *et al.*, 1994). Ce gène code pour une protéine de 376 acides aminés et affiche un poids moléculaire de 43 kDa. Cette protéine nommée yOGG1 a été isolée et ses substrats, identifiés. yOGG1 peut exciser la 8-oxo-7,8-dihydroguanine ainsi que la Me-FapyGua insérées dans des oligonucléotides et catalyse également le clivage en 3' d'un site abasique lors d'une réaction de β -élimination. Malgré une similitude frappante de substrats, cette enzyme ne possède pas d'homologie de séquence significative avec la Fpg d'*E.coli*. Cette enzyme est plutôt l'homologue fonctionnel de la Fpg (Mut M). Structuralement parlant, elle se rapproche plus de la superfamille de Endo III. yOGG1 excise de façon efficace la 8-oxo-7,8-dihydroguanine

lorsqu'elle est appariée avec la cytosine (conformation anti pour les deux bases) ou la thymine. Elle est également capable d'exciser la 8-oxo-7,8-dihydroadénine faisant face à une cytosine. En revanche, l'enzyme montre une activité amoindrie lorsque la 8-oxo-7,8-dihydroguanine fait face à une guanine ou à une adénine (Banerjee *et al.*, 2005). Elle s'avère toutefois inopérante sur des lésions comme la FapyAde, ce qui la différencie significativement de son homologue fonctionnel bactérien, la protéine Fpg (David & Williams, 1998).

Les structures résolues par diffraction aux rayons X de la « 8-oxoguanine DNA glycosylase » OGG1 liée à un fragment d'ADN contenant un résidu 8-oxo-7,8-dihydroguanine fournirent les premières informations sur le mécanisme d'action de cette enzyme. Retrouvée également chez les mammifères, sous deux isoformes 1 et 2, 1 : localisation nucléaire ; 2 : localisation mitochondriale) (Boiteux & Radicella, 2000; Slupphaug *et al.*, 2003), cette enzyme est bifonctionnelle. L'activité catalytique d'OGG1 sur ses substrats préférentiels, la 8-oxo-7,8-dihydroguanine ou encore les Fapy-G, s'effectue grâce aux résidus lysine et acide aspartique contenus dans son site actif (Rosenquist *et al.*, 1997). La reconnaissance est assurée par un mécanisme biphasique qui n'est pas sans rappeler celui de l'UNG. En effet, l'OGG1 interagit par ses acides aminés (création de liaisons hydrogène) en position Asn 149, Arg 154 et Arg 204, ceci préférentiellement avec la cytosine complémentaire. Si la base est reconnue en tant que substrat, alors l'excision a lieu. De façon intéressante, une mutation a été découverte dans une lignée cellulaire cancéreuse, au niveau de l'Arg 154, qui est remplacée par l'His. L'enzyme mutée présente une spécificité de substrat beaucoup plus large, concernant la base située en face de la 8oxoGua. Ceci pourrait contribuer à l'induction de mutagenèse en fixant les paires 8-oxoG : A (Scharer, 2003).

Qu'elle provienne de mammifères ou encore de levures, OGG possède une activité lyase extrêmement faible comparativement à son activité glycosylase. Sa forte affinité pour les sites abasiques explique l'observation de cinétiques de renouvellement très lentes. C'est pourquoi OGG1 est stimulée par l'AP endonucléase 1 ; celle-ci empêche la réassociation du site abasique avec la glycosylase et permet ainsi la continuité du processus de réparation des résidus 8-oxo-7,8-dihydroguanine (Hill *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2001b).

2.Réparation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine appariée à une adénine et maintien du pool de dGTP : MYH et MTH: Mut Y et Mut T homologues

La glycosylase MYH (homologue de Mut Y chez les mammifères) procède à l'élimination des résidus normaux d'adénine (conformation anti) incorporés par erreur en face d'un résidu 8-oxo-7,8-dihydroguanine (en conformation syn) (Fromme & Verdine, 2003). Cette enzyme, contient dans son domaine catalytique en position N-terminale (incluant le centre (4Fe-4S) comme l'endonucléase III) la signature « hélice-boucle-hélice » commune à de nombreuses glycosylases /AP lyases, ainsi qu'une boucle riche en glycine et proline (motif HhH-GPD) (Boiteux & Radicella, 2000). Mut Y se distingue de plus par l'existence en position C-terminale d'un domaine supplémentaire, responsable de la reconnaissance de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, qui ressemble beaucoup à celui présent chez Mut T (Fromme *et al.*, 2004a; Volk *et al.*, 2000). De même que la 8-oxodGTP phosphatase, MTH (homologue mammifère de Mut T) hydrolyse le pool de 8-oxodGTP en nucléosides monophosphate correspondant pour éviter l'insertion de nucléotides oxydés au sein de l'ADN néo synthétisé. Ainsi, hOGG1, MYH et MTH constituent un système hautement coordonné pour le maintien de l'intégrité de la guanine. On se réfère à l'association d'activité de ces protéines comme à celle du système GO, de façon identique à celui observé chez la bactérie.

C. L'endonucléase III (Endo III et homologue de NTH1)

Les bases pyrimidiques oxydées sont prises en charges par l'endonucléase III (chez la bactérie) ou par son homologue humain hNTH1. L'endonucléase III a tout d'abord été identifiée chez *E.coli* et reconnue pour ses activités de glycosylase et de lyase (par β élimination) ; les substrats de cette enzyme concernent principalement les dérivés d'oxydation en 5,6 de la thymine ou de la cytosine, l'urée ou le diol de thymine (thymine glycol Tg) (Ikeda *et al.*, 1998).

Cette enzyme reconnaît préférentiellement des bases, endommagées par perte de l'aromaticité du cycle pyrimidine résultant en une modification structurale en 3 dimensions (le cycle n'est plus plan, excepté pour la 5-OH-C ou la 5-OH-U) ainsi que des bases fragmentées (acide oxalurique ou isodialurique). Des homologues de cette enzyme existent chez les levures et les cellules de mammifères (Gossett *et al.*, 1988) et leurs spécificités de substrats sont assez similaires à celles d'Endo III. Ainsi, le clonage du gène de réparation analogue chez la levure a permis de découvrir 2 homologues distincts NTG1 et NTG2 (les différences concernent la présence

ou l'absence d'un domaine Fe/S) et l'implication de ce dernier se révèle dans la possibilité pour NTG1 –qui ne possède pas le centre Fe/S- de réparer les Fapy-guanine, activité qui n'est pas observée pour Endo III (Augeri *et al.*, 1997).

Cette enzyme apparaît donc essentielle dans la réparation de dommages induits de façon oxydative. Toutefois, dans des cellules déficientes pour cette enzyme, la fréquence de mutations demeure inchangée et les cellules ne présentent aucune sensibilité aux agents oxydants, démontrant ainsi l'existence de voies de réparation de « secours » dans ces cellules. D'autres protéines prennent en charge les lésions ordinairement prises en charge par hNTH. (Neil1, Neil2 agissent par β - δ élimination)(Hazra *et al.*, 2002; Takao *et al.*, 2002).

D. Déficiences dans le système de Réparation par Excision de Bases : implications dans certaines pathologies

Le BER ou système de réparation des dommages par excision de bases protège notre ADN des processus oxydatifs médiés par les espèces réactives de l'oxygène, des réactions de méthylation et de désamination. Bien que l'ADN cellulaire soit constamment exposés à la formation de modifications, des déficiences dans la voie de réparation par excision de bases ne semblaient pas être liées de façon causale à la survenue de pathologies précises comme les sont les déficiences du NER avec l'apparition des symptômes de Xeroderma Pigmentosum ou d'un syndrome de Cockaine (Berneburg & Lehmann, 2001; Spivak & Hanawalt, 2006). On sait aujourd'hui que la majorité des cancers humains sont caractérisés par un grand nombre de mutations, dont l'importance augmente avec l'évolution de la tumeur. De plus, les processus cellulaires endogènes (phosphorylation oxydative, métabolisme peroxysomal des acides gras, « burst » oxydatif des cellules phagocytaires ou encore les réactions de métabolisation des cytochromes P450) sont autant de sources d'espèces réactives de l'oxygène susceptibles de contribuer au déséquilibre de la balance entre molécules anti et pro-oxydantes de l'organisme. Qui plus est, un environnement oxydant constitue un facteur aggravant en accentuant la prolifération des cellules tumorales. Elles peuvent ainsi influencer la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses, par stimulation spécifique de certaines cascades de signalisation cellulaire inhibant entre autre, l'apoptose (Benhar *et al.*, 2002). Lorsque les voies de réparation sont submergées ou déficientes, alors la cancérogenèse n'est plus contrôlée et les processus de tumorigénèse sont favorisés. Plusieurs groupes de recherches ont montré une élévation du niveau des dommages de l'ADN, dont la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, due à l'action des espèces réactives de l'oxygène

dans des tissus cancéreux humains, comparativement à des tissus humains sains (Olinski *et al.*, 2003). Plusieurs de ces lésions formées par des processus oxydatifs possèdent des propriétés mutagènes. Par conséquent, un taux élevé de 8-oxo-7,8-dihydroguanine ou d'autres bases oxydées, lié à une insuffisance des systèmes de réparation, au sein d'une tumeur bénigne, pourrait accentuer le risque de transformation en tumeur maligne (Foksinski *et al.*, 2000).

1. Déficience de MYH

Ce n'est que très récemment que fut découverte la relation entre la mutation bi allélique du gène d'une glycosylase impliquée dans le BER (MYH) et la survenue d'un syndrome de polyposie adénomateuse colorectale (syndrome récessif autosomal) associée à un risque très élevé de cancer colorectal (perte d'activité due à la substitution d'un acide aminé dans le site catalytique de reconnaissance spécifique de l'adénine au sein de la poche enzymatique) (Al-Tassan *et al.*, 2002; Cheadle & Sampson, 2003). C'est ainsi la première fois qu'il est montré l'existence d'une corrélation entre une déficience du BER et des modifications phénotypiques. De même, un polymorphisme G/C dans une région fréquemment sujette à épissage dans le gène MYH semblerait avoir un effet inhibiteur ou tout au moins ralentisseur, de la traduction de MYH dans certaines cellules pulmonaires cancéreuses (Yamaguchi *et al.*, 2002). De plus, le locus du gène MYH localisé sur le chromosome 1p31.1-1p34.3, est souvent délété dans plusieurs types de cancers (Nagai *et al.*, 1997).

2. Déficience de OGG1

La première ligne de défense contre les effets mutagènes de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine chez les mammifères est assurée par les glycosylases du BER, plus particulièrement OGG1. Le gène de OGG1 est situé chez l'homme sur le chromosome 3p25. La région 3p subit fréquemment des pertes d'hétérozygotie dans des tumeurs des reins ou du poumon (Naylor *et al.*, 1987). Des réarrangements de cette région, incluant le gène d'OGG1 pourraient, conjugués à la perte d'hétérozygotie, conduire à l'inactivation de l'enzyme et par la même à l'augmentation de la génération de ROS, responsables de l'initiation et de la progression du phénomène de carcinogenèse. Chevillard et al. émettaient l'hypothèse que le gène d'OGG1 pouvait être considéré comme un gène suppresseur de tumeurs (Chevillard *et al.*, 1998). Cette hypothèse a été confirmée par d'autres études, chez la souris. Une déficience en OGG1 conduit à

l'accumulation de lésions pré-mutagènes ainsi qu'à un taux de mutations spontanées plus élevé dans les cellules concernées par la perte de cette enzyme (Klungland *et al.*, 1999; Minowa *et al.*, 2000) du au manque d'élimination de la 8-oxoguanine. De plus, des mutations somatiques sur le gène de hOGG1 identifiées dans certains cancers du rein à cellules claires (Audebert *et al.*, 2000), sont associées à des répartitions erronées de la protéine (localisation cytoplasmique de la β -hOGG1 normalement mitochondriale), créant de ce fait une perturbation dans la concentration d'enzyme disponible pour réparer le génome mitochondrial. La conséquence en découlant est la susceptibilité de mutation du génome mitochondrial augmentée par la déplétion enzymatique, prédisposant ces cellules à la carcinogenèse ou accélérant ce même processus (Audebert *et al.*, 2002). D'autres groupes ont pu démontrer qu'une faible activité d'OGG1 était liée à une augmentation significative du risque de cancer du poumon (Gackowski *et al.*, 2003; Paz-Elizur *et al.*, 2003). Il existerait également un polymorphisme génétique sur le codon 326 du gène de hOGG1 (substitution de la sérine en cystéine notée SER 326 CYS) très fréquent dans la population Japonaise, Chinoise ou Européenne, et apparemment relié à une augmentation de la susceptibilité de survenue de certains cancers de l'œsophage (Xing *et al.*, 2001). La mutation bi-allèlique Cys/Cys au niveau de ce gène, étudiée chez des patients atteints de cancers colorectaux, traduirait une sensibilité encore plus accrue aux facteurs environnementaux susceptibles d'influencer le développement du cancer (Kim *et al.*, 2003).

3. Déficience d'autres enzymes impliquées dans le BER

On peut aussi noter que le polymorphisme de gène de réparation par excision de base comme celui affectant XRCC1 (X-Ray Repair Cross-Complementing group 1) semblerait être responsable de l'incidence accrue de cancers des poumons dans les populations affectées par une substitution de l'arginine en position 194 par un tryptophane (noté Arg194Trp) et une substitution de l'arginine en position 399 par une glycine (noté Arg399Gln) (Chen *et al.*, 2002; David-Beabes & London, 2001; Shen *et al.*, 1998). Cette substitution semble être également impliquée dans l'apparition de cancers de la prostate puisque l'on note que les patients homozygotes Gln/Gln pour l'allèle commun au codon 399 du gène XRCC1 et qui ont un apport faible de vitamine E ou de lycopène présentent un risque de cancer de la prostate significativement plus fort que ceux dont le polymorphisme n'affecte qu'un seul des deux allèles ou bien un codon différent. Cette incidence est directement reliée à l'apport en molécules anti-oxydantes et marque la forte implication des enzymes du BER dans la prévention de la survenue

de cancers, engendrés par un déséquilibre oxydatif, ainsi que la corrélation existante avec des facteurs environnementaux (van Gils *et al.*, 2002).

Il semblerait même que AP Endo/Ref 1 puisse être impliquée dans ces mêmes cancers, puisqu'on dénombre une augmentation considérable de cette enzyme dans les cellules néoplasiques intra épithéliales de la prostate et dans les cellules cancéreuses par rapport à des cellules saines (les niveaux immunohistochimiques de HAP/APE 1 dans les hypertrophies bénignes sont évaluées à 6% contre 58% dans les tissus néoplasiques intra épithéliaux prostatiques et 67% en cas de cancer avéré de la prostate) (Kelley *et al.*, 2001). Cette enzyme, via son rôle dans la réparation par excision de bases pourrait jouer un rôle prédominant dans la physiologie du développement précoce du cancer de la prostate. Elle serait même proposée comme biomarqueur en complément du dosage du peptide antigénique PSA.

VI. Suivi de la réparation des dommages: Différentes techniques utilisées pour la mesure de la réparation des lésions de l'ADN

La mesure de bases altérées de l'ADN au sein d'échantillons biologiques doit répondre à différents pré-requis. Parmi eux, le seuil de détection de ces méthodes doit être au moins de une base oxydée pour 10^6 - 10^7 bases normales dans un échantillon d'ADN d'une taille d'environ 30 microgrammes. D'autres difficultés proviennent parfois du fait de la multiplicité et de l'hétérogénéité des lésions. De plus, l'apparition de réactions d'auto-oxydation pendant la préparation de l'ADN - pouvant mener à l'apparition d'oxydations artéfactuelles de l'ADN- constitue la source majeure de biais méthodologiques dans la plupart des ces méthodes de détection et quantification. Ces méthodes peuvent cependant être utilisées pour suivre la réparation des lésions si ces inconvénients sont maîtrisés.

A. Mesures du taux de dommages dans l'ADN

1. Réparation et méthodes radioactives

L'analyse est menée selon un protocole « standard » : des cellules sont exposées à un stress. L'ADN contenu dans ces cellules est alors endommagé. La finalité de l'analyse consiste à doser les lésions à différents temps « post-stress » de façon à suivre l'évolution de leur réparation. Des

échantillons d'ADN sont recueillis, après extraction des cellules à des temps précis et ces derniers sont incubés en présence d'ATP radioactif, après digestion enzymatique. En effet, le recours au radiomarquage par le ^{32}P est l'outil analytique le plus précis pour mesurer un dommage oxydatif dans l'ADN cellulaire à l'échelle de la base unique. Cette technique est basée sur le marquage radioactif de nucléosides 3'monophosphate, eux-mêmes substrats des polynucléotides kinases. L'analyse par chromatographie sur couche mince de silice des échantillons ainsi marqués révèle la présence de nucléosides diphosphates marqués radioactivement, normaux et modifiés. Une quantification du signal radioactif en fonction du temps permet alors d'évaluer l'activité de réparation des nucléosides lésés (Randerath & Randerath, 1973). La sensibilité de cette méthode est d'une base endommagée détectée parmi 10^7 bases normales dans un échantillon de quelques microgrammes d'ADN. Toutefois, des étapes de pré purification des lésions recherchées sont requises afin de ne pas surestimer la quantité de lésions mesurées (nécessité de l'élimination des nucléosides 3'-dGMP normaux dans le dosage de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, car possible formation de nucléosides oxydés par auto radiolyse dès l'introduction de la fraction radioactive) (Devanaboyina & Gupta, 1996). On peut également ajouter les méthodes « *in situ* », consistant à appliquer un stress sur un échantillon cellulaire (donc créer des sites lésés) et ajouter de la thymidine tritiée dans le milieu de culture. Par mesure de l'incorporation de thymidine marquée et suivi de la radioactivité, on peut ainsi évaluer la capacité de réparation (méthode « unscheduled DNA synthesis) des cellules ainsi traitées (Otto *et al.*, 1999).

2. Réparation et techniques chromatographiques

Les méthodes décrites succinctement dans ce paragraphe illustrent comment la réparation enzymatique des lésions peut être suivie et refléter une capacité de réparation d'un extrait cellulaire donné à un temps donné, celui de l'observation. Ces techniques analytiques sont très fiables pour quantifier le niveau des lésions présentes dans un échantillon d'ADN. Toutefois, ce n'est que par des mesures répétées, faisant chacune appel au même nombre d'étapes intermédiaires de traitement préalable de l'échantillon, que des données concernant les vitesses de réparation de ces lésions pourraient être obtenues. Ces étapes intermédiaires sont lourdes à mettre en œuvre car elles requièrent des phases d'hydrolyse chimique ou une digestion enzymatique de l'ADN extrait. Ainsi, le mélange complexe contenant à la fois l'ADN extrait ainsi que les divers composés nécessaires à sa digestion, est résolu par des méthodes séparatives

efficaces incluant la chromatographie liquide haute performance (CLHP), la chromatographie gazeuse ou bien encore l'électrophorèse capillaire. Toutefois la source majeure d'oxydations artéfactuelles provient toujours de l'étape d'extraction de l'ADN (Cadet *et al.*, 2003).

Le recours à l'utilisation de techniques chromatographiques telles la GC-SM (chromatographie gazeuse couplée à la détection par spectrométrie de masse) ou encore l'électrophorèse capillaire EC permet un dosage d'un grand nombre de dommages. Toutefois, les premières publications utilisant cette méthode ont conduit à la propagation d'informations erronées quant sur la formation des bases oxydées de l'ADN. En moyenne, les taux de 8-oxo-7,8-dihydroguanine étaient surestimés d'un facteur 50 à 300, lorsqu'on les comparait avec les résultats obtenus par analyse de type CLHP-ECD (détection électrochimique) en raison de l'oxydation artéfactuelle des bases guanines non modifiées durant la dérivatization de l'échantillon. Depuis, les méthodes d'analyses font appel à la CLHP couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (Ravanat *et al.*, 1998), permettant une détection simultanée de plusieurs lésions, une optimisation quasi parfaite des conditions d'extractions des lésions de l'ADN ainsi que des paramètres de détection. Ces techniques bien que précises et sensibles, ne sont pas adaptées à l'analyse biologique *in situ* en contexte hospitalier, où le nombre d'échantillon à analyser et le temps de préparation de chaque échantillon se transforment rapidement en inconvénients. La détection et le dosage par CLHP-EC ou CLHP-SM/SM des bases oxydées - notamment celui de la 8-oxo-dGuo dans l'urine ou le sang, pourraient toutefois servir d'index de stress oxydant de l'ADN cellulaire (Badouard *et al.*, 2005). Ces méthodes sont des outils de choix en terme de sensibilité et de fiabilité d'analyse. Les résultats sont obtenus de façon fractionnée (traitement intermédiaire de l'échantillon), nécessitent un appareillage complexe, coûteux de surcroît et limité en terme de rapidité d'analyse, d'où l'intérêt évident de développer un outil permettant une détection en ligne, facile d'emploi et permettant une application avec un haut débit d'analyses ainsi qu'un suivi de l'activité enzymatique en temps réel et non plus un dosage final.

3. Réparation au niveau cellulaire : le test des Comètes et l'élution alcaline

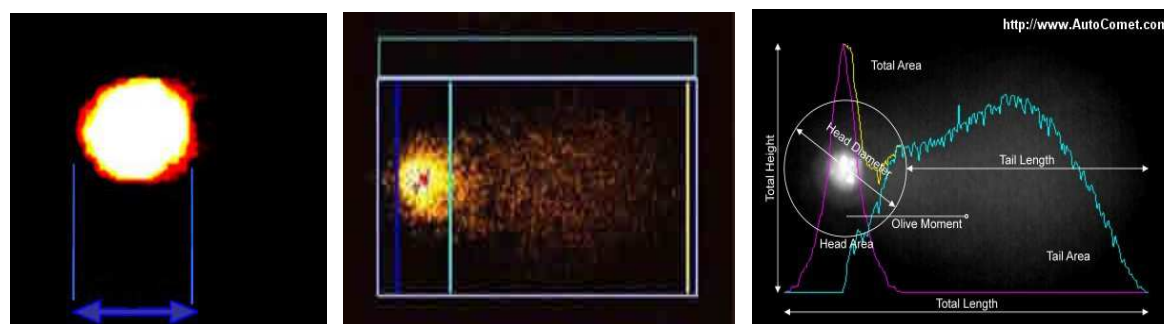
Des méthodes de détection des dommages de l'ADN ne nécessitant pas d'étape d'extraction ont été proposées. Toutefois, certaines d'entre elles impliquent une étape de lyse cellulaire *in situ* ; la révélation des sites de coupures de chaînes, dus à l'apparition de bases modifiées, est effectuée par une étape préalable d'incubation avec les endonucléases appropriées, les glycosylases,

impliquées dans la réparation de l'ADN endommagé. Les coupures ainsi créées sont mesurées par diverses techniques incluant la méthode Comète ou encore l'élution alcaline. Ces tests permettent d'évaluer la présence d'ADN de poids moléculaire (PM) inférieur à la normale. Un petit PM signifie la présence de fragments issus d'une atteinte clastogénique. Les deux tests diffèrent par les techniques de séparations utilisées. Dans le cas du premier, c'est l'élution sur filtre qui est utilisée. Dans celui de l'essai des Comètes, c'est la séparation électrophorétique en gel d'agarose. Dans ces deux tests, une évaluation quantitative relative des dommages peut être estimée.

La technique des Comètes, encore connue sous le nom de « Single Cell Gel Electrophoresis » (SCGE), est un outil de choix pour la mesure des cassures de brins d'ADN et les études à caractère épidémiologique. Pour augmenter la spécificité de détection, la technique a été adaptée par Singh et coll. (Singh *et al.*, 1988). Cette méthode peut être appliquée à la fois sur cellules prolifératives ou non prolifératives issues de tissus, connus pour être les premiers en contact avec des substances mutagènes ou carcinogènes comme peut d'ailleurs l'être la méthode de détection des dommages par élution alcaline (Hengstler *et al.*, 2003; Kohn *et al.*, 1976).

Le test des Comètes consiste en une électrophorèse à pH alcalin d'un échantillon d'ADN libéré à partir de cellules isolées, pour la mise en évidence des coupures de brins et éventuellement de bases oxydées de l'ADN. Effectué en milieu alcalin, il permet dès lors non seulement la détection des coupures franches, mais aussi celle de sites alcali labiles et des sites de coupures incomplètes de l'ADN. L'ADN endommagé est retrouvé sous forme de fragments plus courts ; un champ électrophorétique permet la migration sur une distance plus importante que des fragments d'ADN de poids moléculaire plus élevé. On mesure ainsi différents paramètres concernant la longueur des « traînées » d'ADN, qui forment la queue de la comète, visualisées sous microscope après couplage avec un intercalant fluorescent et analyse par des logiciels d'imagerie adaptés.

Figure 15: La technique des Comètes



Cellule témoin 30 µm

Cellule stressée

Différents paramètres pour l'analyse

Comètes : Vue au microscope à fluorescence

Ce test s'avère être plus informatif lorsqu'on le conjugue à l'utilisation d'enzymes spécifiques de réparation de l'ADN (incubation avec Fpg ou Endo III immédiatement après l'étape de lyse cellulaire) (Sauvaigo *et al.*, 2002) ou bien encore à une immunodétection grâce à des anticorps anti-lésions spécifiques (Sauvaigo *et al.*, 1998). Les phénomènes d'auto-oxydation - due à l'extraction et à la digestion par les exonucléases, certainement responsables de bruit de fond artificiel dans les autres techniques - sont ici minimisés du fait de la conformation plus compacte de l'ADN étudié ainsi que de la période plus courte d'incubation enzymatique et de la présence d'agarose (Collins *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1996). Ce test s'avère assez rapide, simple et suffisamment sensible pour détecter les cassures de l'ADN au sein d'un faible nombre de cellules ; pour peu que l'analyse soit menée avec des sondes fluorescentes appropriées, la méthode pourra même mettre en évidence des différences au niveau des gènes dans les dommages induits dans l'ADN (Applications FISH-COMET).

L'élution alcaline repose sur le même principe de traitement de l'échantillon d'ADN en milieu alcalin, mais la séparation des fragments d'ADN engendrés par ce traitement s'effectue par élution successive sur filtres. Les fractions collectées contiennent alors les fragments d'intérêt (Koch & Giandomenico, 1994; Zuk & Zaborowska, 1987). Ces méthodes, d'une grande sensibilité pour les comètes et très informatives (Koch & Giandomenico, 1994) sont d'une utilisation plus abordables (Singh *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1994) que la mesure des bases oxydées de l'ADN, effectué par des méthodes chromatographiques par exemple. La méthode des Comètes et l'élution alcaline (d'ailleurs progressivement supplantée par la première citée) permettent ainsi d'évaluer la génotoxicité de molécules (influence du Cadmium ou du plomb sur l'ADN et importance de la corrélation aux facteurs environnementaux (Hengstler *et al.*, 2003)). Ces méthodes permettent aussi d'évaluer les capacités de réparation des cellules après action d'un stress radio-induit (Epe *et al.*, 1993). La cinétique de réparation est évaluée par la

disparition progressive des cassures d'ADN dans le temps. De ce fait, la méthode des Comètes ou l'éluion alcaline (désormais moins utilisée) peuvent être utilisées des cellules tumorales en culture, pour évaluer la réponse génomique (résistance ou mort cellulaires) de ces cellules à divers traitements radio thérapeutiques (Brennan *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 1995; Kassie *et al.*, 2000; Olive & Banath, 1993).

Notons toutefois le caractère restrictif du protocole des Comètes: la méthode a été utilisée essentiellement jusqu'à présent sur des échantillons issus de cultures cellulaires. Même si aujourd'hui, cette méthode peut être appliquée à des échantillons sanguins (Hininger *et al.*, 2002; Hininger *et al.*, 2004) ou même tissulaires, elle n'en nécessite pas moins une préparation de l'échantillon avant utilisation, phase durant laquelle certains biais artéfactuels pourraient apparaître.

B. Mesures biologiques utilisant un vecteur exogène lésé

1. Test de réactivation en cellule hôte : « Host cell reactivation assay »

La méthode de réactivation « Host Cell Reactivation » (HCR) est un test de suivi de la réparation enzymatique d'un ADN lésé *in cellulo*. Ce test repose sur la transfection d'ADN endommagé exogène dans des cellules intactes. L'ADN exogène lésé est souvent constitué d'un gène rapporteur, exposé au rayonnement UV ou soumis à un dommage chimique et ensuite inséré dans un plasmide. Le gène rapporteur le plus communément utilisé est celui de la luciférase ou de la « chloramphénicol acétyl transférase » (CAT). Ainsi, par la mesure de l'expression du produit du gène rapporteur, on peut suivre la quantité d'ADN réactivé et par là même, réparé. Cette technique, lorsqu'on l'associe à l'utilisation d'une irradiation UV pour l'induction de dommages, permet d'évaluer les capacités cellulaires de réparation couplée à la transcription, lorsque la lésion se trouve sur le brin transcrit (Arnold & Rainbow, 1996). Elle peut également, lorsqu'on associe la transfection du gène rapporteur à celle correspondant à un gène déficient dans une souche cellulaire, permettre le suivi du rétablissement du « phénotype » de la souche concernée (Carreau *et al.*, 1995). Plus récemment, cette méthode a trouvé un intérêt médical lié à la compréhension de mécanismes de réparation enzymatique, régulateurs de certaines fonctions cellulaires impliquées dans l'oncogenèse (Wang *et al.*, 2006) ou dans le vieillissement cellulaire (Takahashi *et al.*, 2005). Cette méthode, dans son stade actuel de développement, permet l'accès

quasi direct à l'étude d'une partie des voies de réparation par excision de nucléotides. Toutefois, malgré l'absence d'étape d'extraction de l'ADN cellulaire, les expériences de transfection et les compétences requises en biologie moléculaire rendent difficiles l'application de cette méthode et l'interprétation des résultats.

2. Suivi de la réparation par excision-resynthèse : les puces plasmides

Des travaux effectués au laboratoire (communications personnelles de S.Sauvaigo, demande de brevet CEA WO-A-2004/059004) ont pour but de développer un support poly-lysine sur lequel sont fixés des plasmides lésés (lésions photo-induites, ou issues de traitement par des endoperoxydes...). Ces supports greffés sont incubés en présence d'enzymes de réparation (soit purifiées, soit contenues dans des extraits cellulaires). Les enzymes reconnaissent les lésions et les incisent. Le suivi de réparation se fait par la quantification du signal fluorescent qui apparaît, lors de la réincorporation de nucléotides marqués par des fluorochromes, consécutivement à l'excision des bases endommagées. La réparation est donc estimée en fonction du signal fluorescent. Cette méthode permet l'étude d'un nombre important de lésions, de façon parallélisée, mais nécessite néanmoins un appareillage coûteux pour le greffage des sondes plasmides à la surface des supports et pour la détection du signal

C. Méthodes physicochimiques utilisant des sondes synthétiques portant les lésions

1. L'analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide (EGPA)

Les méthodes traditionnelles d'évaluation d'activité enzymatique de coupure ou d'incision d'acides nucléiques sont basées depuis l'origine sur l'utilisation de substrats d'acides nucléiques, incubés avec des enzymes (glycosylases) puis analysés par électrophorèse sur gel. Des oligonucléotides *synthétiques* ont ainsi trouvé des applications dans de nombreuses études cinétiques d'enzymes de restriction, dans lesquelles la formation des produits de réaction est suivie soit par analyse par EGPA, soit par CLHP. L'échantillon oligonucléotidique contient la lésion d'intérêt. Il est incubé en présence de la glycosylase en charge de sa réparation et après

électrophorèse, la quantification des signaux radioactifs obtenus permet un suivi des capacités de réparation des enzymes. En effet ces méthodes permettent l'accès à une évaluation des activités de réparation enzymatique des lésions par dosage de la radioactivité résiduelle au niveau du site de coupure. Après exploitation des données, il devient possible d'accéder aux constantes et paramètres cinétiques caractéristiques de l'enzyme pour sa lésion. Souvent utilisée *in vitro* pour la mesure de réparation de lésions insérées dans des oligonucléotides synthétiques et traités par des enzymes purifiées, cette méthode est également adaptée au suivi de la réparation d'ADN cellulaire, après extraction de ce dernier et post marquage radioactif, comme précédemment mentionné.

Bien qu'extrêmement sensibles, ces méthodes sont complexes et discontinues. Elles impliquent un fractionnement des diverses étapes d'analyse de l'échantillon : les prélèvements doivent être effectués à des temps donnés et leur analyse n'est pas toujours immédiate. De plus, leur application en contexte hospitalier est proscrite en raison des difficultés engendrées par le rayonnement radioactif et le temps nécessaire pour l'analyse.

2. Réparation suivie par fluorescence sur support

Comme précédemment mentionné, les oligonucléotides synthétiques lésés en un site précis constituent des outils de choix pour l'étude des capacités de réparation d'une enzyme purifiée ou d'un extrait cellulaire. De nombreux supports miniatures ont été développés afin de paralléliser ces études et d'augmenter ainsi le débit d'analyse (Lockhart *et al.*, 1996). Sauvaigo *et al.* (Sauvaigo *et al.*, 2004) ont développé sur ces principes, un test miniature *in vitro*, permettant de quantifier l'activité de coupure enzymatique de glycosylases sur des oligonucléotides lésés en des sites prédéfinis et marqués en 3' par une biotine. Ces substrats sont au préalable hybridés sur des sondes complémentaires, elles-mêmes fixées sur un support circulaire contenues dans les puits d'une microplaque (OLigo Sorbent Assay, OLISA). Une fois traités par les enzymes de réparation souhaitées (purifiées ou issues d'un extrait protéique cellulaire), les substrats sont analysés par fluorescence et révélés par l'ajout d'un conjugué streptavidine-phycoérythrine. Si la glycosylase a clivé la lésion sélectionnée, on ne détecte alors aucun signal en solution, signe d'une activité enzymatique. Selon l'intensité du signal, la quantité d'enzyme ou d'extraits utilisée et la densité d'oligonucléotides fixés dans les puits, on peut en déduire les paramètres cinétiques de l'enzyme sur sa lésion (Sauvaigo *et al.*, 2004).

Ainsi, cette méthode a l'avantage de limiter les biais d'analyse au maximum, notamment ceux liés à la préparation de l'ADN. En effet, la fixation des oligonucléotides sur le support peut être automatisée et la quantification du signal est effectuée par la spectrofluorimétrie. Par cette technique d'analyse, on peut aisément quantifier des activités de réparation enzymatique notamment dans des milieux complexes comme les extraits cellulaires, d'où une utilisation intéressante en recherche clinique. Cependant, des biais artéfactuels peuvent être induits par les étapes de fixation des oligonucléotides sur le support pouvant par la même influencer les interactions enzyme substrat. De plus, il est plus délicat d'interpréter une diminution de signal au sein d'un milieu fluorescent comparativement à une apparition.

3. Réparation et analyse par spectrométrie de masse

L'analyse d'échantillons par MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight) permet quant à elle la mise en évidence des produits de coupures issus de la réparation d'une lésion ainsi que la détermination du mécanisme d'action de l'enzyme impliquée ($\beta\delta$ ou β élimination) par mesure de la masse du produit obtenu. Cette technique permet aujourd'hui l'identification de mécanisme de coupure spécifique de telle ou telle pathologie, d'où son importance et son intérêt en analyse médicale (Kulp *et al.*, 2006). Toutefois, de nombreuses étapes de préparation de l'échantillon en amont de son analyse sont nécessaires, rendant le processus analytique complexe et consommateur en temps.

Ces techniques, comme pour l'utilisation de la radioactivité, présentent l'inconvénient d'être fractionnée au niveau de leur mise en œuvre. En effet, le délai d'attente entre le traitement de l'échantillon et l'analyse des dommages est augmenté par les nombreuses étapes intermédiaires : extraction de l'ADN des échantillons, hydrolyse en nucléosides et purification des échantillons suivi d'une analyse par CLHP-SM/SM ou CLHP couplée à une détection électrochimique (dosage de la 8-oxoGua), étape de co-cristallisation sur la matrice du MALDI, analyse parfois rendue difficile par la complexité des milieux utilisés (milieux cellulaires) exploitation des données...De plus, le traitement préalable de l'échantillon peut s'avérer une source de biais non négligeable : suroxydation de lésions, dégradation involontaire des échantillons par coupure après action du laser MALDI à trop forte intensité, temps de paramétrage et calibration de l'analyse propre à chaque échantillon...

Pour ces différentes raisons, on préfère parfois l'utilisation de méthodes analytiques plus simples et plus rapides.

4. Intérêt du FRET pour la réparation

Comme précédemment décrit, les réactions de clivage de l'ADN par des enzymes de réparation sont des événements importants dans la vie cellulaire. Il est donc utile de développer un outil de détection et de quantification de cette activité enzymatique, qui puisse permettre de suivre l'efficacité d'action de l'enzyme en temps réel et donner accès à ses constantes caractéristiques. L'évolution des biotechnologies dans le domaine de l'imagerie a conduit à des progrès considérables dans la détermination et le contrôle de ces divers paramètres. Les méthodes se simplifient au maximum pour une meilleure maîtrise des paramètres variables. De plus, le développement constant des moyens de détection de signaux luminescents favorise l'amélioration incessante des méthodes d'analyse. La spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence couplée à l'usage de substrats marqués par des fluorochromes s'affiche dès 1997 comme un outil de dépistage d'activités enzymatiques pour les études de « screening » à haut débit (« High Throughput Screening » HTS). Celles-ci sont effectuées entre autre dans l'industrie pharmaceutique pour la découverte de nouveaux principes actifs (Koltermann & Kettling, 1997). Plus récemment, de nouvelles méthodes s'inspirant du principe de FRET proposent l'utilisation de « molecular beacons » modifiés comme substrats afin d'étudier les cinétiques de clivages enzymatiques de lésions insérées dans des oligonucléotides synthétiques (Li *et al.*, 2000).

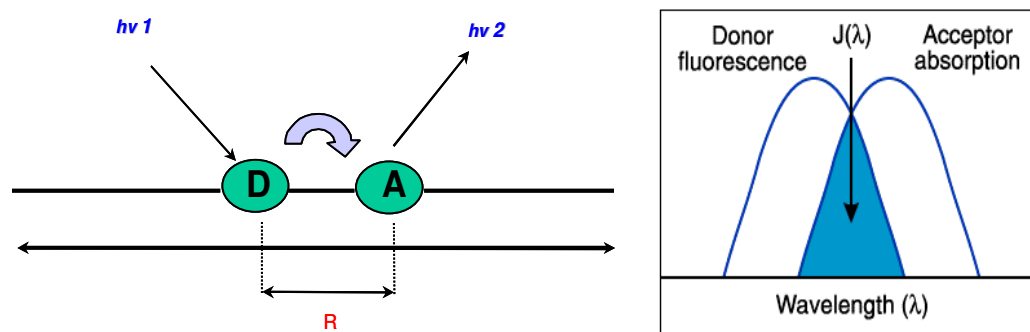
VII. Qu'est ce que le FRET ?

A. Principe

Le transfert par résonance d'énergie de fluorescence (FRET) est un procédé physique par lequel l'énergie est transférée de façon non radiative d'une molécule chromophore excitée (le donneur D) à un autre chromophore (l'accepteur A) au moyen d'un couplage intermoléculaire dipôle dipôle (résonance par induction de champ électrique oscillant entre les états singulet de transitions électroniques des molécules excitées). Les paramètres essentiels à définir pour un

transfert efficace sur des distances de 10 à 100 Å concernent le spectre de fluorescence du donneur D ainsi que le spectre d'absorbance de A, sachant que ce dernier doit recouvrir partiellement le spectre de D (cf. Figure 16). De plus, afin que l'interaction vectorielle dipôle-dipôle ait lieu, chacun des moments de transition des dipôles D et A doit être orienté spatialement de façon favorable l'un par rapport à l'autre (face à face ou l'un des deux doit avoir un degré de liberté de rotation et d'orientation). Cette dernière condition est d'ordinaire satisfaite pour les chromophores attachés à des biomolécules en solution. Enfin, le transfert est non radiatif : D n'émet pas de photon lumineux et A n'absorbe pas de photon (Glazer & Mathies, 1997).

Figure 16: le principe du FRET



Le taux de transfert d'énergie de fluorescence dipôle dipôle est donné par l'équation de Förster : $k_T = (R_0/R)^6/\tau_D$.

Avec τ_D : demi-vie du fluorochrome

R_0 : Longueur de Förster théorique pour un couple de fluorochromes

R : Longueur reportée expérimentalement entre les deux fluorochromes

Ce rendement de transfert d'énergie dépend à la fois de la demi-vie de fluorescence du donneur (mesurée en l'absence de l'accepteur A), de la distance R entre les deux groupements chromophores et de la valeur du R_0 : longueur de Förster, constante caractéristique d'un couple donné de chromophores. La valeur de R_0 tient compte de la demi-vie des fluorophores, des orientations relatives des moments de transition des deux groupements chromophores ainsi que de l'indice de réfraction du milieu d'étude et de $J(\lambda)$, l'aire sous la courbe symbolisant le chevauchement spectral entre l'émission par le donneur et l'absorption par l'accepteur.

B. Applications biologiques du FRET

La fluorescence est une méthode très sensible pour étudier des interactions moléculaires. Suite au séquençage du génome humain, l'identification de séquences d'ADN précises est désormais possible et la mise en évidence de fonctions biologiques associées entraîne le développement de nouveaux moyens de détection. Le FRET est une méthode d'analyse spectroscopique qui donne accès à des informations structurales globales sur des macromolécules en solution. Une grande quantité d'informations peut être obtenue des analyses par fluorescence en général et plus spécifiquement par FRET. Toutefois, il est nécessaire que ces études soient effectuées en comparaison avec d'autres techniques de référence, dont les critères de validité ont été établis.

1. FRET et étude moléculaire structurale

Appliqué généralement à la spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence (FCS), le FRET *in vitro* s'avère être particulièrement adapté à l'étude des macromolécules biologiques, notamment les acides nucléiques. En effet, le FRET permet le suivi d'interactions moléculaires (Ghosh *et al.*, 1994). La spectroscopie de corrélation croisée de fluorescence a permis d'affiner le choix des couples de fluorochromes ; l'amélioration dans la discrimination spatiale et spectrale des molécules observées par FRET, et le couplage FRET-FCS s'avère être un outil de choix pour l'étude d'interaction protéine-ADN (Xu *et al.*, 2001) ou encore le suivi de changements conformationnels (Clegg, 1992; Lilley & Wilson, 2000; Sixou *et al.*, 1994). Permettant également de calculer des distances inter ou intra moléculaires (Clegg, 1992), le FRET apparaît totalement complémentaire des études menées par RMN (la RMN donne des indications sur des distances de l'ordre de 5 Å, alors que le FRET permet d'appréhender des distances de 10 à 80-100 Å) (Lilley & Wilson, 2000)) et de la modélisation 3D de la molécule ainsi que des études menées par diffraction aux rayons X. Ce principe de fluorescence permet entre autre de pouvoir développer, par le couplage de molécules fluorescentes à des antigènes, des méthodes de détection immunologiques (Lichlyter *et al.*, 2003). Il autorise également l'observation des conséquences de ces interactions : ainsi, on peut observer les phénomènes de recombinaison de l'ADN initiés par la protéine Rec A chez *E.coli* (Bazemore *et al.*, 1997).

2. FRET et dynamique cellulaire

En plus des données structurales auxquelles le FRET donne accès, il permet également de statuer sur des phénomènes cellulaires. Par exemple, plusieurs groupes ont prouvé l'intérêt du couplage FRET-FLIM (« fluorescence lifetime-imaging ») dans l'étude de phénomènes dynamiques cellulaires résolus en temps (Murata *et al.*, 2000). C'est ainsi par exemple qu'a pu être observée et comprise la fusion des endosomes dans des cellules isolées (Oida *et al.*, 1993). L'étude par FRET, suivie par microscopie confocale a également mis en évidence des compartiments de séquestration spécifiques de certains composants cellulaires (quantité et distribution spatiale de l'AMPC dans les neurones sensitifs) (Bacskai *et al.*, 1993).

3. Amélioration des sondes et conséquences analytiques

Le FRET a largement contribué au développement de nouvelles techniques analytiques. Les progrès effectués dans la conception de ces sondes a permis l'utilisation de nouvelles balises moléculaires (« molecular beacons ») plus fiables et surtout plus sensibles. Ce format d'analyse transforme la détection par hybridation fluorescente *in situ* de séquences particulières d'ADN. Ces méthodes plus élégantes proposent des sondes - ou balises moléculaires - en solution, sous forme repliée en épingle à cheveux (« hairpin ») marquées à leurs extrémités par deux chromophores dont un « quencher » (Tyagi & Kramer, 1996). A l'état initial, aucune fluorescence n'est normalement décelable. Lors de la reconnaissance de la séquence d'intérêt, la sonde s'hybride avec son brin complémentaire, les deux chromophores s'éloignent et la détection des séquences recherchées est effectuée par suivi de l'apparition de fluorescence dans le milieu d'analyse. Ainsi construite, la sonde « quenchée » n'émet aucune fluorescence initiale alors qu'une fois hybridée à sa séquence complémentaire, la fluorescence sera maximale (Glazer & Mathies, 1997). Les progrès technologiques vont aujourd'hui dans le sens de l'amélioration de la conception des sondes (étude de l'effet de séquence de la sonde, influence de la nature de la boucle, de la présence de la boucle, etc.) ou encore du format d'analyse. En effet, les formats classiques d'analyses supportées véhiculent des problèmes inhérents à l'hétérogénéité du milieu réactionnel (fixation non spécifique de la sonde ou de la cible sur le support). De plus, les techniques PCR (« Polymerase Chain Reaction ») (appliquées à des formats de détection en phase homogène type Light-cycler) ont pour inconvénient un rapport signal sur bruit élevé. On sait également que certains fluorochromes sont sensibles aux conditions expérimentales telles

que le pH ou encore la force ionique, la température... (Des guides décrivent ces propriétés sur des sites Internet tels que « Molecular Probes »...) On peut également optimiser les sondes par le choix des couples de fluorochromes ; il existe des classifications répertoriant les caractéristiques principales du FRET existant entre des fluorophores définis ou celles de différents « quenchers ». Basée sur ces avancées technologiques, la technique PCR a subi de grands changements avec pour conséquences une amélioration significative des produits formés. Différentes techniques dérivées ont vu le jour et leurs potentialités respectives ont permis d'affiner les conclusions d'analyses (développement de la PCR quantitative en temps réel (Bustin, 2000), PCR multiplex basée sur la détection simultanée de plusieurs fluorochromes par plusieurs canaux différents (Shengqi *et al.*, 2002; Tyagi *et al.*, 1998).

Ces sondes utilisées en PCR permettent à la fois le suivi de la réaction en temps réel, mais également la discrimination de polymorphismes dus à un changement de base dans la séquence codante d'intérêt (Solinas *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002), d'où leur avantage en « screening » biomédical. Outre l'intérêt évident de ces nouveaux marqueurs pour des analyses *in vitro*, leur utilisation dans des tests *ex vivo* commence à être envisagée. En effet, des ADN anti-sens synthétiques fluorescents ou encore des « siRNA » (silencing RNA) ont été proposés comme agents thérapeutiques d'infections virales ou de pathologies métastatiques (Biard *et al.*, 2005; Hendry & Sharpe, 2003). L'hybridation correcte ainsi que l'inhibition sélective du gène peut donc être suivie par fluorescence (FRET ou FISH : Fluorescence in situ hybridization).

4. Fluorescence et détection d'activités enzymatiques

Cette course à l'amélioration constante des capacités de détection et de quantification que nous permet ce principe physique de fluorescence ont permis l'émergence d'études cinétiques utilisant le FRET comme support de détection dès 2001 (Hashimoto *et al.*, 2001). Ces études ont prouvé l'efficacité ainsi que l'originalité de la détection du processus enzymatique. C'est ainsi qu'ont été vérifiées, en phase homogène, les activités d'endonucléases de restriction (Eisenschmidt *et al.*, 2002) avec accès aux premiers paramètres cinétiques des enzymes étudiées ou bien encore la sensibilité aux protéases de certaines molécules virales (Hirata *et al.*, 2003).

Jusqu'alors, les voies de réparation spécifiques des dommages de l'ADN précédemment décrites étaient restées inexplorées par de telles techniques de fluorescence. En 2001, Liquin Xia et Tim O'Connor relatent dans leur article (Xia & O'Connor, 2001) l'exploration des voies de réparation par les glycosylases. La quantification de la radioactivité de substrats lésés, marqués à leur

extrémité 5' par du [^{32}P], s'effectue après l'étape de réparation, en présence de microbilles supportant un oligonucléotide complémentaire de celui réparé. Cet article, dans l'esprit d'utilisation de bio senseurs pour suivre et comprendre la réparation de l'ADN a ouvert la porte à tous les développements qui ont suivi. Pour exemple, en 2002, une étude paraît sur la quantification de l'activité enzymatique de photolyase (Kundu *et al.*, 2002) avec l'utilisation d'un substrat en forme d'épingle à cheveux, doublement marqué à ses extrémités par des groupements chromophores et contenant le substrat préférentiel de la photolyase (dimère de pyrimidine photoinduit) dans la boucle de l'épingle. Cet article, écrit dans la lignée de celui de 2001 permet la quantification d'activités d'enzymes de réparation *in vitro*.

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

Sur la base de ces études et animés d'une volonté de développer un outil analytique pratique, rapide, sensible, automatisable et potentiellement utilisable en analyse à haut débit, nous avons orienté nos recherches vers la conception et la validation d'un substrat original et spécifique. Il s'agit d'un substrat oligonuléotidique en forme d'« hairpin », ou épingle à cheveu, conçu pour l'étude des activités de réparation de l'ADN par les glycosylases du BER, mesurées par le suivi de l'inhibition du « quenching » de fluorescence (dépôt d'une demande de brevet en 2002 (D. Gasparutto, J.Cadet, brevet FR2836926 (2002))). **Par commodité, ces sondes seront nommées « sondes FRET » dans ce manuscrit, bien que le mécanisme étudié grâce à elles consiste au suivi de l'inhibition de l'extinction de fluorescence de ces substrats.** Les résultats ainsi obtenus seront validés par comparaison à ceux d'études classiques par analyses radioactives sur gel (EGPA). Le cahier des charges inclut également la possibilité de miniaturisation du système, pour des analyses parallélisées, continues, exploitables en directe et nécessitant un appareillage restreint. Notre démarche est étayée par la recherche d'activités glycosylases, concernant la réparation de bases oxydées qui impliquent la voie de réparation par excision de bases BER. Nous voulions de même axer notre détection sur la fluorescence en temps réel, comme signal privilégié. Pour répondre à la plus grande majorité des contraintes évoquées, nous avons opté pour une sonde oligonucléotidique synthétique, lésée en un site précis et unique, pour permettre l'analyse d'activité d'enzymes de réparation. Ces sondes signaleraient l'activité enzymatique de réparation dont elles seraient l'objet par des variations de signaux de fluorescence. L'observation de ces derniers serait permise par la présence de groupements chromophores sur la sonde, répondant selon leur nature, au principe de transfert par résonance d'énergie de fluorescence ou FRET. Ce travail propose le développement et la validation de cette nouvelle méthode de détection d'activité de réparation des dommages de l'ADN. L'étude est conduite en phase homogène, utilisant à la fois les performances de chimie de synthèse d'oligonucléotides modifiés (synthèse via la chimie des phosphoramidites), permettant de décliner les lésions étudiées ainsi que les fluorophores greffés et d'appliquer l'étude à des enzymes purifiées ou des extraits cellulaires. Cette étude a permis le développement de divers formats d'analyses (miniaturisation sur « lab-on-chip », parallélisation par analyse dans un format lecteur microplaque).

Nous rapportons dans ce manuscrit les résultats relatifs au développement de cette technique d'analyse ainsi que les projets que nous avons pu mettre en oeuvre.

Bibliographie

- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R., & et al. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, **260**, 812-6.
- Acharya, N., Roy, S., & Varshney, U. (2002) Mutational analysis of the uracil DNA glycosylase inhibitor protein and its interaction with Escherichia coli uracil DNA glycosylase. *J Mol Biol*, **321**, 579-90.
- Al-Tassan, N., Chmiel, N.H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A.L., Williams, G.T., Hodges, A.K., Davies, D.R., David, S.S., Sampson, J.R., & Cheadle, J.P. (2002) Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*, **30**, 227-32.
- Arnold, W.R. & Rainbow, A.J. (1996) Host cell reactivation of irradiated adenovirus in UV-sensitive Chinese hamster ovary cell mutants. *Mutagenesis*, **11**, 89-94.
- Audebert, M., Charbonnier, J.B., Boiteux, S., & Radicella, J.P. (2002) Mitochondrial targeting of human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1 is impaired by a somatic mutation found in kidney cancer. *DNA Repair (Amst)*, **1**, 497-505.
- Audebert, M., Chevillard, S., Levalois, C., Gyapay, G., Vieillefond, A., Klijanienko, J., Vielh, P., El Naggar, A.K., Oudard, S., Boiteux, S., & Radicella, J.P. (2000) Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res*, **60**, 4740-4.
- Augeri, L., Lee, Y.M., Barton, A.B., & Doetsch, P.W. (1997) Purification, characterization, gene cloning, and expression of Saccharomyces cerevisiae redoxendonuclease, a homolog of Escherichia coli endonuclease III. *Biochemistry*, **36**, 721-9.
- Bacskai, B.J., Hochner, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R., & Tsien, R.Y. (1993) Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons. *Science*, **260**, 222-6.
- Badouard, C., Masuda, M., Nishino, H., Cadet, J., Favier, A., & Ravanat, J.L. (2005) Detection of chlorinated DNA and RNA nucleosides by HPLC coupled to tandem mass spectrometry as potential biomarkers of inflammation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **827**, 26-31.
- Bailly, V., Verly, W.G., O'Connor, T., & Laval, J. (1989) Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by Escherichia coli [formamidopyrimidine]DNA glycosylase. *Biochem J*, **262**, 581-9.
- Banerjee, A., Yang, W., Karplus, M., & Verdine, G.L. (2005) Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA. *Nature*, **434**, 612-8.
- Barzilay, G. & Hickson, I.D. (1995) Structure and function of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Bioessays*, **17**, 713-9.
- Bazemore, L.R., Takahashi, M., & Radding, C.M. (1997) Kinetic analysis of pairing and strand exchange catalyzed by RecA. Detection by fluorescence energy transfer. *J Biol Chem*, **272**, 14672-82.
- Benhar, M., Engelberg, D., & Levitzki, A. (2002) ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep*, **3**, 420-5.
- Berdal, K.G., Bjoras, M., Bjelland, S., & Seeberg, E. (1990) Cloning and expression in Escherichia coli of a gene for an alkylbase DNA glycosylase from Saccharomyces cerevisiae; a homologue to the bacterial alkA gene. *Embo J*, **9**, 4563-8.
- Berneburg, M. & Lehmann, A.R. (2001) Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv Genet*, **43**, 71-102.
- Biard, D.S., Despras, E., Sarasin, A., & Angulo, J.F. (2005) Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res*, **3**, 519-29.
- Blair, I.A. (2001) Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Exp Gerontol*, **36**, 1473-81.
- Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S., & Hanawalt, P.C. (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, **40**, 359-69.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., & Laval, J. (1987) Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein. *Embo J*, **6**, 3177-83.

- Boiteux, S. & Radicella, J.P. (2000) The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*, **377**, 1-8.
- Brennan, L.A., Morris, G.M., Wasson, G.R., Hannigan, B.M., & Barnett, Y.A. (2000) The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes. *Br J Nutr*, **84**, 195-202.
- Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, **25**, 169-93.
- Cadet, J., Bellon, S., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., Romieu, A., & Sauvaigo, S. (2004) Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **23**, 33-43.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., & Ravanat, J.L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **131**, 1-87.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., & Ravanat, J.L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res*, **531**, 5-23.
- Campalans, A., Marsin, S., Nakabeppu, Y., O'Connor T, R., Boiteux, S., & Radicella, J.P. (2005) XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 826-35.
- Carreau, M., Eveno, E., Quilliet, X., Chevalier-Lagente, O., Benoit, A., Tanganelli, B., Stefanini, M., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., Sarasin, A., & et al. (1995) Development of a new easy complementation assay for DNA repair deficient human syndromes using cloned repair genes. *Carcinogenesis*, **16**, 1003-9.
- Cheadle, J.P. & Sampson, J.R. (2003) Exposing the MYTH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet*, **12 Spec No 2**, R159-65.
- Chen, S., Tang, D., Xue, K., Xu, L., Ma, G., Hsu, Y., & Cho, S.S. (2002) DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*, **23**, 1321-5.
- Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.F., Oudard, S., Dutrillaux, B., & Boiteux, S. (1998) Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene*, **16**, 3083-6.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., & Kaina, B. (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, **193**, 3-34.
- Clarke, N.D., Kvaal, M., & Seeberg, E. (1984) Cloning of Escherichia coli genes encoding 3-methyladenine DNA glycosylases I and II. *Mol Gen Genet*, **197**, 368-72.
- Clegg, R.M. (1992) Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol*, **211**, 353-88.
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G., & Stetina, R. (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, **375**, 183-93.
- Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M., & Stetina, R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect*, **104 Suppl 3**, 465-9.
- Collins, A.R., Ma, A.G., & Duthie, S.J. (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*, **336**, 69-77.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C., & Leach, D.R. (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell*, **8**, 1163-74.
- David, S.S. & Williams, S.D. (1998) Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair. *Chem Rev*, **98**, 1221-1262.
- David-Beabes, G.L. & London, S.J. (2001) Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer*, **34**, 333-9.
- de Oliveira, R., van der Kemp, P.A., Thomas, D., Geiger, A., Nehls, P., & Boiteux, S. (1994) Formamidopyrimidine DNA glycosylase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3760-4.
- Devanaboyina, U. & Gupta, R.C. (1996) Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by 32P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues. *Carcinogenesis*, **17**, 917-24.
- Dizdaroglu, M. (2003) Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, **531**, 109-26.

- Dolan, M.E., Moschel, R.C., & Pegg, A.E. (1990) Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5368-72.
- Dolan, M.E. & Pegg, A.E. (1997) O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clin Cancer Res*, **3**, 837-47.
- Douki, T., Court, M., & Cadet, J. (2000) Electrospray-mass spectrometry characterization and measurement of far-UV-induced thymine photoproducts. *J Photochem Photobiol B*, **54**, 145-54.
- Douki, T., Ravanat, J.L., Pouget, J.P., Testard, I., & Cadet, J. (2006) Minor contribution of direct ionization to DNA base damage induced by heavy ions. *Int J Radiat Biol*, **82**, 119-27.
- Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbo, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., & Krokan, H.E. (2004) Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1389-407.
- Drotschmann, K., Yang, W., & Kunkel, T.A. (2002) Evidence for sequential action of two ATPase active sites in yeast Msh2-Msh6. *DNA Repair (Amst)*, **1**, 743-53.
- Eisenschmidt, K., Lanio, T., Jeltsch, A., & Pingoud, A. (2002) A fluorimetric assay for on-line detection of DNA cleavage by restriction endonucleases. *J Biotechnol*, **96**, 185-91.
- Epe, B., Pflaum, M., & Boiteux, S. (1993) DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat Res*, **299**, 135-45.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., & Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, **11**, 81-128.
- Falnes, P.O., Johansen, R.F., & Seeberg, E. (2002) AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in Escherichia coli. *Nature*, **419**, 178-82.
- Fishel, M.L., Seo, Y.R., Smith, M.L., & Kelley, M.R. (2003) Imbalancing the DNA base excision repair pathway in the mitochondria; targeting and overexpressing N-methylpurine DNA glycosylase in mitochondria leads to enhanced cell killing. *Cancer Res*, **63**, 608-15.
- Foksinski, M., Kotzbach, R., Szymanski, W., & Olinski, R. (2000) The level of typical biomarker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is higher in uterine myomas than in control tissues and correlates with the size of the tumor. *Free Radic Biol Med*, **29**, 597-601.
- Fromme, J.C., Banerjee, A., Huang, S.J., & Verdine, G.L. (2004a) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature*, **427**, 652-6.
- Fromme, J.C., Banerjee, A., & Verdine, G.L. (2004b) DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 43-9.
- Fromme, J.C. & Verdine, G.L. (2003) DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM. *J Biol Chem*, **278**, 51543-8.
- Gackowski, D., Speina, E., Zielinska, M., Kowalewski, J., Rozalski, R., Siomek, A., Paciorek, T., Tudek, B., & Olinski, R. (2003) Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Res*, **63**, 4899-902.
- Ghosh, S.S., Eis, P.S., Blumeyer, K., Fearon, K., & Millar, D.P. (1994) Real time kinetics of restriction endonuclease cleavage monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3155-9.
- Glazer, A.N. & Mathies, R.A. (1997) Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 94-102.
- Gossett, J., Lee, K., Cunningham, R.P., & Doetsch, P.W. (1988) Yeast redoxendonuclease, a DNA repair enzyme similar to Escherichia coli endonuclease III. *Biochemistry*, **27**, 2629-34.
- Graves, R.J., Felzenszwalb, I., Laval, J., & O'Connor, T.R. (1992) Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of Escherichia coli. *J Biol Chem*, **267**, 14429-35.
- Guza, R., Rajesh, M., Fang, Q., Pegg, A.E., & Tretyakova, N. (2006) Kinetics of O(6)-Methyl-2'-deoxyguanosine Repair by O(6)-Alkylguanine DNA Alkyltransferase within K-ras Gene-Derived DNA Sequences. *Chem Res Toxicol*, **19**, 531-8.
- Haber, J.E. (2000) Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*, **16**, 259-64.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, **219**, 1-14.
- Hanawalt, P.C. (1987) Preferential DNA repair in expressed genes. *Environ Health Perspect*, **76**, 9-14.

- Hanawalt, P.C. (2001) Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat Res*, **485**, 3-13.
- Hashimoto, S., Wang, B., & Hecht, S.M. (2001) Kinetics of DNA cleavage by Fe(II) Bleomycins. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7437-7438.
- Hazra, T.K., Kow, Y.W., Hatahet, Z., Imhoff, B., Boldogh, I., Mokkapati, S.K., Mitra, S., & Izumi, T. (2002) Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. *J Biol Chem*, **277**, 30417-20.
- Hendry, B.M. & Sharpe, C.C. (2003) Targeting Ras genes in kidney disease. *Nephron Exp Nephrol*, **93**, e129-33.
- Hengstler, J.G., Bolm-Audorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Gotte, W., Jung, D., Mayer-Popken, O., Fuchs, J., Gebhard, S., Bienfait, H.G., Schlink, K., Dietrich, C., Faust, D., Epe, B., & Oesch, F. (2003) Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, **24**, 63-73.
- Hill, J.W., Hazra, T.K., Izumi, T., & Mitra, S. (2001) Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res*, **29**, 430-8.
- Hininger, I., Chollat-Namy, A., Osman, M., Arnaud, J., Ducros, V., Favier, A., & Roussel, A.M. (2002) Beneficial effect of an antioxidant micronutrient-enriched food on DNA damage: experimental study in rats using a modified comet assay in total blood. *IARC Sci Publ*, **156**, 395-6.
- Hininger, I., Chollat-Namy, A., Sauvaigo, S., Osman, M., Faure, H., Cadet, J., Favier, A., & Roussel, A.M. (2004) Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat Res*, **558**, 75-80.
- Hirata, J., Ariese, F., Gooijer, C., & Irth, H. (2003) Continuous-flow protease assay based on fluorescence resonance energy transfer. *Analytica Chimica Acta*, **478**, 1-10.
- Ide, H. & Kotera, M. (2004) Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull*, **27**, 480-5.
- Ikeda, S., Biswas, T., Roy, R., Izumi, T., Boldogh, I., Kurosky, A., Sarker, A.H., Seki, S., & Mitra, S. (1998) Purification and characterization of human NTH1, a homolog of Escherichia coli endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue. *J Biol Chem*, **273**, 21585-93.
- Izumi, T., Wiederhold, L.R., Roy, G., Roy, R., Jaiswal, A., Bhakat, K.K., Mitra, S., & Hazra, T.K. (2003) Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. *Toxicology*, **193**, 43-65.
- Jeggo, P.A. (1998) Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res*, **150**, S80-91.
- Jiricny, J. (1998) Replication errors: cha(lle)nging the genome. *Embo J*, **17**, 6427-36.
- Jiricny, J. & Nystrom-Lahti, M. (2000) Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 157-61.
- Kassie, F., Parzefall, W., & Knasmuller, S. (2000) Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res*, **463**, 13-31.
- Kelley, M.R., Cheng, L., Foster, R., Tritt, R., Jiang, J., Broshears, J., & Koch, M. (2001) Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **7**, 824-30.
- Kim, J.I., Park, Y.J., Kim, K.H., Song, B.J., Lee, M.S., Kim, C.N., & Chang, S.H. (2003) hOGG1 Ser326Cys polymorphism modifies the significance of the environmental risk factor for colon cancer. *World J Gastroenterol*, **9**, 956-60.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., & Barnes, D.E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13300-5.
- Koch, C.J. & Giandomenico, A.R. (1994) The alkaline elution technique for measuring DNA single strand breaks: increased reliability and sensitivity. *Anal Biochem*, **220**, 58-65.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A., & Friedman, C.A. (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry*, **15**, 4629-37.
- Kolodner, R.D. (1995) Mismatch repair: mechanisms and relationship to cancer susceptibility. *Trends Biochem Sci*, **20**, 397-401.

- Kolodner, R.D. & Alani, E. (1994) Mismatch repair and cancer susceptibility. *Curr Opin Biotechnol*, **5**, 585-94.
- Koltermann, A. & Ketting, U. (1997) Principles and methods of evolutionary biotechnology. *Biophys Chem*, **66**, 159-77.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M., & Slupphaug, G. (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett*, **476**, 73-7.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D.E., & Lindahl, T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *Embo J*, **15**, 6662-70.
- Kulp, K.S., Berman, E.S., Knize, M.G., Shattuck, D.L., Nelson, E.J., Wu, L., Montgomery, J.L., Felton, J.S., & Wu, K.J. (2006) Chemical and Biological Differentiation of Three Human Breast Cancer Cell Types Using Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Anal Chem*, **78**, 3651-8.
- Kundu, L.M., Burgdorf, L.T., Kleiner, O., Batschauer, A., & Carell, T. (2002) Cleavable substrate containing molecular beacons for the quantification of DNA-photolyase activity. *Chembiochem*, **3**, 1053-60.
- Labahn, J., Scharer, O.D., Long, A., Ezaz-Nikpay, K., Verdine, G.L., & Ellenberger, T.E. (1996) Structural basis for the excision repair of alkylation-damaged DNA. *Cell*, **86**, 321-9.
- Lahue, R.S., Au, K.G., & Modrich, P. (1989) DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, **245**, 160-4.
- Li, J.J., Geyer, R., & Tan, W. (2000) Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, **28**, E52.
- Lichlyter, D.J., Grant, S.A., & Soykan, O. (2003) Development of a novel FRET immunosensor technique. *Biosens Bioelectron*, **19**, 219-26.
- Lilley, D.M. & Wilson, T.J. (2000) Fluorescence resonance energy transfer as a structural tool for nucleic acids. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 507-17.
- Lindahl, T. (1974) An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 3649-53.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-15.
- Lindahl, T. & Nyberg, B. (1974) Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **13**, 3405-10.
- Liu, L., Nakatsuru, Y., & Gerson, S.L. (2002) Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin Cancer Res*, **8**, 2985-91.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., & Brown, E.L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, **14**, 1675-80.
- Loeb, L.A. & Cheng, K.C. (1990) Errors in DNA synthesis: a source of spontaneous mutations. *Mutat Res*, **238**, 297-304.
- Marsin, S., Vidal, A.E., Sossou, M., Menissier-de Murcia, J., Le Page, F., Boiteux, S., de Murcia, G., & Radicella, J.P. (2003) Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem*, **278**, 44068-74.
- Matsumoto, Y., Kim, K., & Bogenhagen, D.F. (1994) Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol*, **14**, 6187-97.
- McTigue, M.M., Rieger, R.A., Rosenquist, T.A., Iden, C.R., & De Los Santos, C.R. (2004) Stereoselective excision of thymine glycol lesions by mammalian cell extracts. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 313-22.
- Mellon, I., Bohr, V.A., Smith, C.A., & Hanawalt, P.C. (1986) Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 8878-82.
- Mellon, I., Spivak, G., & Hanawalt, P.C. (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, **51**, 241-9.
- Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H., Masumura, K., Nohmi, T., Nishimura, S., & Noda, T. (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4156-61.

- Mitra, S., Izumi, T., Boldogh, I., Bhakat, K.K., Hill, J.W., & Hazra, T.K. (2002) Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes. *Free Radic Biol Med*, **33**, 15-28.
- Mullaart, E., Lohman, P.H., Berends, F., & Vijg, J. (1990) DNA damage metabolism and aging. *Mutat Res*, **237**, 189-210.
- Murata, S., Herman, P., Lin, H.J., & Lakowicz, J.R. (2000) Fluorescence lifetime imaging of nuclear DNA: effect of fluorescence resonance energy transfer. *Cytometry*, **41**, 178-85.
- Nagai, H., Pineau, P., Tiollais, P., Buendia, M.A., & Dejean, A. (1997) Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **14**, 2927-33.
- Nakabeppu, Y., Kondo, H., & Sekiguchi, M. (1984a) Cloning and characterization of the alkA gene of Escherichia coli that encodes 3-methyladenine DNA glycosylase II. *J Biol Chem*, **259**, 13723-9.
- Nakabeppu, Y., Miyata, T., Kondo, H., Iwanaga, S., & Sekiguchi, M. (1984b) Structure and expression of the alkA gene of Escherichia coli involved in adaptive response to alkylating agents. *J Biol Chem*, **259**, 13730-6.
- Naylor, S.L., Johnson, B.E., Minna, J.D., & Sakaguchi, A.Y. (1987) Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature*, **329**, 451-4.
- O'Connor, T.R. & Laval, J. (1991) Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine. *Biochem Biophys Res Commun*, **176**, 1170-7.
- Oida, T., Sako, Y., & Kusumi, A. (1993) Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophys J*, **64**, 676-85.
- Olinski, R., Gackowski, D., Rozalski, R., Foksinski, M., & Bialkowski, K. (2003) Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat Res*, **531**, 177-90.
- Olive, P.L. & Banath, J.P. (1993) Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *Int J Radiat Biol*, **64**, 349-58.
- Ozaki, K., Kato, T., Asamoto, M., Wild, C.P., Montesano, R., Nagao, S., Iwase, T., Matsumoto, K., & Tsuda, H. (1993) Decreased dimethylnitrosamine-induced O6- and N7-methyldeoxyguanosine levels correlate with development and progression of lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Jpn J Cancer Res*, **84**, 1245-51.
- Parikh, S.S., Putnam, C.D., & Tainer, J.A. (2000a) Lessons learned from structural results on uracil-DNA glycosylase. *Mutat Res*, **460**, 183-99.
- Parikh, S.S., Walcher, G., Jones, G.D., Slupphaug, G., Krokan, H.E., Blackburn, G.M., & Tainer, J.A. (2000b) Uracil-DNA glycosylase-DNA substrate and product structures: conformational strain promotes catalytic efficiency by coupled stereoelectronic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5083-8.
- Paz-Elizur, T., Krupsky, M., Blumenstein, S., Elinger, D., Schechtman, E., & Livneh, Z. (2003) DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 1312-9.
- Pegg, A.E. & Byers, T.L. (1992) Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *Faseb J*, **6**, 2302-10.
- Pouget, J.P., Frelon, S., Ravanat, J.L., Testard, I., Odin, F., & Cadet, J. (2002) Formation of modified DNA bases in cells exposed either to gamma radiation or to high-LET particles. *Radiat Res*, **157**, 589-95.
- Ravanat, J.L. & Cadet, J. (1995) Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products. *Chem Res Toxicol*, **8**, 379-88.
- Ravanat, J.L., Duret, B., Guiller, A., Douki, T., & Cadet, J. (1998) Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **715**, 349-56.
- Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O., & Grollman, A.P. (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7429-34.
- Sancar, A. (1996) DNA excision repair. *Annu Rev Biochem*, **65**, 43-81.
- Saparbaev, M., Mani, J.C., & Laval, J. (2000) Interactions of the human, rat, Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli 3-methyladenine-DNA glycosylases with DNA containing dIMP residues. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1332-9.

- Sauvaigo, S., Guerniou, V., Rapin, D., Gasparutto, D., Caillat, S., & Favier, A. (2004) An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage. *Anal Biochem*, **333**, 182-92.
- Sauvaigo, S., Petec-Calin, C., Caillat, S., Odin, F., & Cadet, J. (2002) Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to DNA induced by low doses of gamma-radiation: use of YOYO-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions. *Anal Biochem*, **303**, 107-9.
- Sauvaigo, S., Serres, C., Signorini, N., Emonet, N., Richard, M.J., & Cadet, J. (1998) Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Anal Biochem*, **259**, 1-7.
- Scharer, O.D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 2946-74.
- Seeberg, E., Eide, L., & Bjoras, M. (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci*, **20**, 391-7.
- Shapiro, R. & Klein, R.S. (1966) The deamination of cytidine and cytosine by acidic buffer solutions. Mutagenic implications. *Biochemistry*, **5**, 2358-62.
- Shen, H.M., Ratnam, S., & Storb, U. (2005) Targeting of the activation-induced cytosine deaminase is strongly influenced by the sequence and structure of the targeted DNA. *Mol Cell Biol*, **25**, 10815-21.
- Shen, M.R., Jones, I.M., & Mohrenweiser, H. (1998) Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res*, **58**, 604-8.
- Shengqi, W., Xiaohong, W., Suhong, C., & Wei, G. (2002) A new fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique. *Anal Biochem*, **309**, 206-11.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., & Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, **175**, 184-91.
- Singh, N.P., Stephens, R.E., & Schneider, E.L. (1994) Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol*, **66**, 23-8.
- Sinha, R.P. & Hader, D.P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*, **1**, 225-36.
- Sixou, S., Szoka, F.C., Jr., Green, G.A., Giusti, B., Zon, G., & Chin, D.J. (1994) Intracellular oligonucleotide hybridization detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Nucleic Acids Res*, **22**, 662-8.
- Slupphaug, G., Kavli, B., & Krokan, H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, **531**, 231-51.
- Smith, C.A. (1987) DNA repair in specific sequences in mammalian cells. *J Cell Sci Suppl*, **6**, 225-41.
- Solinas, A., Brown, L.J., McKeen, C., Mellor, J.M., Nicol, J., Thelwell, N., & Brown, T. (2001) Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res*, **29**, E96.
- Spivak, G. & Hanawalt, P.C. (2006) Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 13-22.
- Steinum, A.L. & Seeberg, E. (1986) Nucleotide sequence of the tag gene from Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, **14**, 3763-72.
- Swann, P.F. (1990) Why do O6-alkylguanine and O4-alkylthymine miscode? The relationship between the structure of DNA containing O6-alkylguanine and O4-alkylthymine and the mutagenic properties of these bases. *Mutat Res*, **233**, 81-94.
- Takahashi, Y., Moriwaki, S., Sugiyama, Y., Endo, Y., Yamazaki, K., Mori, T., Takigawa, M., & Inoue, S. (2005) Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: a possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity. *J Invest Dermatol*, **124**, 435-42.
- Takao, M., Kanno, S., Shiromoto, T., Hasegawa, R., Ide, H., Ikeda, S., Sarker, A.H., Seki, S., Xing, J.Z., Le, X.C., Weinfeld, M., Kobayashi, K., Miyazaki, J., Muijtjens, M., Hoeijmakers, J.H., van der Horst, G., & Yasui, A. (2002) Novel nuclear and mitochondrial glycosylases revealed by disruption of the mouse Nth1 gene encoding an endonuclease III homolog for repair of thymine glycols. *Embo J*, **21**, 3486-93.
- Tchou, J. & Grollman, A.P. (1995) The catalytic mechanism of Fpg protein. Evidence for a Schiff base intermediate and amino terminus localization of the catalytic site. *J Biol Chem*, **270**, 11671-7.

- Thompson, C.L. & Sancar, A. (2002) Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene*, **21**, 9043-56.
- Tyagi, S., Bratu, D.P., & Kramer, F.R. (1998) Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*, **16**, 49-53.
- Tyagi, S. & Kramer, F.R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, **14**, 303-8.
- van Gils, C.H., Bostick, R.M., Stern, M.C., & Taylor, J.A. (2002) Differences in base excision repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk: an example of polymorphisms in the XRCC1 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 1279-84.
- Vidal, A.E., Boiteux, S., Hickson, I.D., & Radicella, J.P. (2001a) XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *Embo J*, **20**, 6530-9.
- Vidal, A.E., Hickson, I.D., Boiteux, S., & Radicella, J.P. (2001b) Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1285-92.
- Volk, D.E., House, P.G., Thiviyathan, V., Luxon, B.A., Zhang, S., Lloyd, R.S., & Gorenstein, D.G. (2000) Structural similarities between MutT and the C-terminal domain of MutY. *Biochemistry*, **39**, 7331-6.
- Wang, H., Li, J., Liu, H., Liu, Q., Mei, Q., Wang, Y., Zhu, J., He, N., & Lu, Z. (2002) Label-free hybridization detection of a single nucleotide mismatch by immobilization of molecular beacons on an agarose film. *Nucleic Acids Res*, **30**, e61.
- Wang, J., Chin, M.Y., & Li, G. (2006) The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation. *Cancer Res*, **66**, 1906-11.
- Ward, J.F. (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **35**, 95-125.
- Wilstermann, A.M. & Osheroff, N. (2001) Base excision repair intermediates as topoisomerase II poisons. *J Biol Chem*, **276**, 46290-6.
- Xia, L. & O'Connor, T.R. (2001) DNA glycosylase activity assay based on streptavidin paramagnetic bead substrate capture. *Anal Biochem*, **298**, 322-6.
- Xing, D.Y., Tan, W., Song, N., & Lin, D.X. (2001) Ser326Cys polymorphism in hOGG1 gene and risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*, **95**, 140-3.
- Xu, H., Frank, J., Trier, U., Hammer, S., Schroder, W., Behlke, J., Schafer-Korting, M., Holzwarth, J.F., & Saenger, W. (2001) Interaction of fluorescence labeled single-stranded DNA with hexameric DNA-helicase RepA: a photon and fluorescence correlation spectroscopy study. *Biochemistry*, **40**, 7211-8.
- Yamaguchi, S., Shinmura, K., Saitoh, T., Takenoshita, S., Kuwano, H., & Yokota, J. (2002) A single nucleotide polymorphism at the splice donor site of the human MYH base excision repair genes results in reduced translation efficiency of its transcripts. *Genes Cells*, **7**, 461-74.
- Zharkov, D.O., Ishchenko, A.A., Douglas, K.T., & Nevinsky, G.A. (2003) Recognition of damaged DNA by Escherichia coli Fpg protein: insights from structural and kinetic data. *Mutat Res*, **531**, 141-56.
- Zheng, H., Wang, X., Warren, A.J., Legerski, R.J., Nairn, R.S., Hamilton, J.W., & Li, L. (2003) Nucleotide excision repair- and polymerase eta-mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links. *Mol Cell Biol*, **23**, 754-61.
- Zuk, J. & Zaborowska, D. (1987) Alkaline elution of yeast DNA: a simple method of detection of DNA single-strand breaks. *Mutagenesis*, **2**, 229-34.

Deuxième partie

Synthèse des sondes oligonucléotidiques : théorie et mise en œuvre

Deuxième partie

Synthèse des sondes oligonucléotidiques : théorie et mise en œuvre

I.	Synthèse des sondes oligonucléotidiques : théorie et mise en œuvre	75
A.	Cahier des charges	75
B.	Synthèse chimique d'ADN.....	76
1.	Principes généraux.....	76
a	Le couplage internucléotidique	77
b	La synthèse d'oligonucléotides par la méthode au phosphoramidite sur support solide.....	79
F	Le cycle de condensation	79
F	Synthèse d'oligonucléotides modifiés par insertion de lésions et groupements fluorophores	81
2.	Séquence des oligonucléotides d'intérêt	81
C.	Purification des mélanges bruts de synthèse	83
D.	Analyse par spectroscopie d'absorption des sondes contrôle et modifiées.....	85
E.	Caractérisation des oligonucléotides	87
1.	Analyse par spectrométrie de masse	87
2.	Vérification de l'insertion des lésions au sein des sondes nucléiques par analyse EGPA.....	90
II.	Caractérisation des substrats oligonucléotidiques par fluorescence	92
A.	Linéarité du signal détecté.....	92
B.	Confirmation de l'insertion spécifique des groupements chromophores	93
1.	Par analyse spectrale.....	93
2.	Par vérification du « quenching » de fluorescence sur les sondes linéaires : Evolution de fluorescence d'un oligonucléotide linéaire simple brin fluorescent hybridé à son brin complémentaire portant un « quencher ».....	95
3.	Par détermination des températures de fusion des sondes “hairpins”	97

I. Synthèse des sondes oligonucléotidiques : théorie et mise en œuvre

A. Cahier des charges

La mise en œuvre de cette étude repose donc sur le principe suivant : les petites lésions des bases de l'ADN, formées par oxydation ou par méthylations sont prises en charge et réparées par des enzymes spécifiques de la voie de Réparation par Excision de Bases (BER), les ADN *N*-glycosylases. La première étape de cette réparation consiste en la reconnaissance et l'excision de la base endommagée, générant une coupure dans la séquence d'ADN. C'est sur ce processus que nous avons développé notre modèle d'étude et cette nouvelle technique d'analyse.

En cherchant à élaborer un outil de détection et de quantification des activités enzymatiques de réparation des ces lésions par des mesures de fluorescence, plusieurs points ont été soulevés. En effet, le cahier des charges de notre modèle devait répondre à certaines exigences de détection :

Tout d'abord, le support doit permettre un criblage précis des activités à étudier. La détection se doit d'être spécifique afin de pouvoir associer un signal détecté à une activité de réparation précise. De plus, ce support doit permettre une évaluation extemporanée de l'activité enzymatique étudiée, directement quantifiable et utilisable pour cibler différentes lésions (donc différentes activités enzymatiques) et ce au sein de différents milieux.

Ensuite, la détection doit être réalisée par fluorescence. Il faut ainsi construire un modèle permettant le suivi de l'apparition d'un signal fluorescent spécifique dès la reconnaissance du substrat par son enzyme. Cette contrainte structurale supplémentaire nous a orienté vers la conception d'un modèle dans lequel un groupement fluorescent, porté par une séquence d'ADN comportant la lésion d'intérêt, est « quenché » à l'état initial et activé après action de l'enzyme sur la lésion.

Enfin, le substrat d'intérêt doit permettre une analyse par plusieurs moyens de détection. Pour cette raison, notre modèle d'étude intègre les fonctionnalisations chimiques nécessaires pour une analyse concomitante par les méthodes conventionnelles habituellement utilisées : marquage radioactif et électrophorèse sur gel d'acrylamide (EGPA), spectrométrie de masse, chromatographie liquide haute performance.

Ainsi prises en compte dans ce cahier des charges, ces contraintes de modélisation nous ont orienté vers la synthèse chimique, d'un substrat oligonucléotidique modifié, comportant la lésion d'intérêt ainsi que des groupements fluorophores à chaque extrémité de la structure. Afin de répondre aux caractéristiques de fluorescence envisagées (quenching de fluorescence à l'état

initial et apparition de fluorescence dès la reconnaissance enzymatique), la séquence du substrat a été conçue pour être autocomplémentaire afin de stabiliser la structure en épingle à cheveux ou “*hairpin*”, propice au phénomène de FRET, sur lequel nous voulons baser notre détection. En effet, la conformation “*hairpin*” assure le ratio 1 :1 entre le groupement fluorescent et le quencher, permettant par là même une diminution considérable de la fluorescence résiduelle initiale. Celle-ci ne sera à attribuer qu’à l’efficacité plus ou moins grande de l’extinction de fluorescence du quencher. La lésion est insérée dans la séquence de l’oligonucléotide en milieu de bras, afin de demeurer accessible aux enzymes. Une seule lésion est insérée par substrat oligonucléotidique, mais plusieurs sondes seront testées afin d’élargir au maximum le potentiel d’utilisation de cet outil. Enfin, une extrémité OH est laissée libre en 5’, adjacente au fluorochrome, afin de permettre un marquage au phosphore radioactif pour une analyse sur gel simultanée. Voici exposés dans cette partie les étapes d’élaboration, de purification et d’analyse de notre modèle. Les parties suivantes traiteront des résultats et tests consécutifs à l’élaboration de notre modèle d’étude ainsi que des différentes applications biologiques et développements méthodologiques réalisés ou initiés.

B. Synthèse chimique d’ADN

La chimie, qu’elle soit physique, organique, biologique ou synthétique, permet la compréhension et l’évaluation des changements structuraux et des effets biologiques consécutifs à la présence d’un dommage au sein d’un génome. La chimie de l’ADN permet la synthèse de fragments, substrats pour des études de réactivité structurale et biologique des acides nucléiques. En voici ici exposés les principes généraux et plus particulièrement la méthode au phosphoramidite, méthode de synthèse utilisée pour la préparation des oligonucléotides modifiés utilisés.

1. Principes généraux

Synthétiser un fragment d’ADN consiste à relier des nucléosides entre eux par un groupement phosphate, en formant des liens phosphodiester. Cet enchaînement doit respecter l’ordre naturel d’une chaîne nucléique : la fonction alcool secondaire (3’-OH) du 2-désoxyribose du premier nucléoside relie la fonction alcool primaire (5’-OH) du 2-désoxyribose du second nucléoside. Du fait de la plus grande réactivité de la fonction alcool primaire, la synthèse chimique s’effectue

généralement par couplage d'un monomère phosphorylé en position 3'-OH sur la fonction 5'-OH libre d'un nucléoside (c'est à dire de 3' vers 5').

Les différentes fonctions chimiques portées par les nucléotides peuvent être à l'origine de réactions secondaires parasites lors de cette synthèse nucléique. Il est donc indispensable de les protéger. Les groupements protecteurs concernent les fonctions amines exocycliques des bases (exceptée la thymine), les fonctions hydroxyle des 2-désoxyriboses et la fonction acide du phosphate. Les amines des bases sont souvent protégées par des groupements benzoyle pour la cytosine et l'adénine, ou encore le groupement isobutyryle pour la guanine.

En fin d'élongation un traitement basique permet la déprotection des bases et du phosphate internucléotidique, ainsi que la rupture de la liaison ester avec le bras de jonction. Selon la nature des groupements protecteurs, la méthode de déprotection peut être aménagée. En effet, le traitement en milieu alcalin se fait généralement en conditions concentrée et à chaud (16 h dans l'ammoniaque à 60°C). Toutefois, l'instabilité de certains nucléosides modifiés par exemple, implique une déprotection en conditions plus douces (traitement ammoniacal à température ambiante pendant 4 h). Le groupement diméthoxytrityle (DMTr) quant à lui, est éliminé de la position 5' du 2-désoxyribose par un traitement acide.

Ainsi déprotégés, les oligonucléotides synthétisés sont prêts à être purifiés soit par chromatographie liquide haute performance (CLHP) soit par électrophorèse sur gel d'acrylamide et récupération après ombrage UV.

a Le couplage internucléotidique

Plusieurs techniques d'assemblage des nucléosides ont été mises au point ; elles diffèrent par la nature de la fonction phosphorylante utilisée pour préparer la liaison internucléotidique.

Les premiers travaux sur la synthèse oligonucléotidique ont été effectués par l'équipe de Todd et de Michelson en 1955. Ils ont permis la mise au point de la synthèse via la méthode au phosphotriester (Michelson & Todd, 1955) Toutefois, la mise au point au début des années 80 de la synthèse en phase solide, qui autorise des couplages plus rapides et, a marqué le déclin de la voie phosphotriester, peu réactive, au profit de la méthode chlorophosphite, plus performante

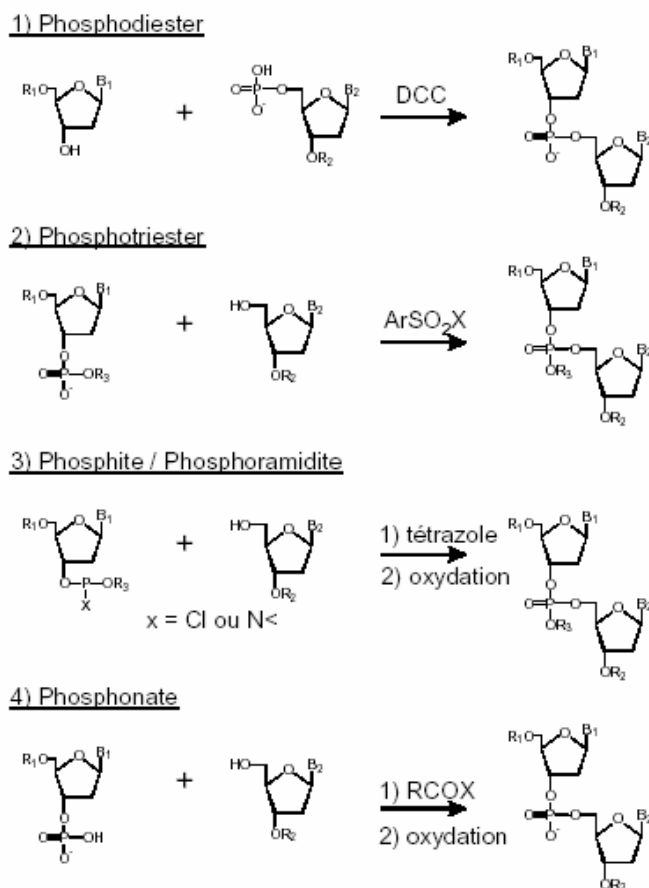
(toutefois, l'instabilité due à la grande réactivité de la liaison P-Cl explique l'abandon de cette dernière).

La voie phosphodiester a été introduite par Khorana à la fin des années cinquante (Gilham & Khorana, 1958). De conception plus simple, elle conduit directement en présence d'un agent de condensation (DCC : dicyclohexylcarbodiimide) au dinucléoside phosphodiester désiré. Adaptée à la synthèse d'oligodéoxyribonucléotides de poids moléculaire modérément élevé, cette méthode a permis d'effectuer en 1970 la première synthèse totale du gène de l'ARN de transfert de l'alanine chez la levure (Agarwal *et al.*, 1970). Toutefois, la voie phosphodiester présente de nombreux inconvénients, en particulier des difficultés de purification des intermédiaires chargés, une diminution rapide des rendements avec l'augmentation de la longueur de la chaîne et de nombreuses réactions secondaires. Cette méthode a été totalement abandonnée.

Dans les années 1980, Beaucage et Caruthers utilisèrent des monomères plus stables: les phosphoramidites (dérivés du phosphore trivalent à liaison P-N)(Beaucage & Iyer, 1992; Caruthers *et al.*, 1980). En contre partie de cette stabilité, les phosphoramidites nécessitent une activation par un acide faible (tétrazole) pour réagir convenablement lors du couplage. Cette méthode permet d'obtenir avec des temps de couplage très brefs des rendements presque quantitatifs. Cette méthode, utilisée dans ce travail sera présentée de façon plus détaillée ultérieurement.

Enfin, la dernière méthode d'assemblage des oligonucléotides est la voie dite au H-phosphonate, introduite par Matteucci et Froehler dès 1986 (Froehler *et al.*, 1986). Cette approche ne nécessite aucune protection des phosphates internucléotidiques et une seule oxydation finale est effectuée une fois l'oligonucléotide totalement assemblé. Cette méthode est bien adaptée à la préparation d'oligonucléotides modifiés sur le squelette phosphodiester (phosphorothioates, phosphoramidates,) utilisés comme séquences « antisens » (Goodchild, 1990). Toutefois, en dépit de ces aspects prometteurs, l'intérêt pour la chimie du H-phosphonate s'est amoindri en raison de l'émergence de problèmes qui ont été révélés ultérieurement : difficultés de purification à grande échelle des synthons de départ et réactions d'acylation parasites au cours du couplage. De ces quatre méthodes de couplage, la chimie du phosphoramidite est la plus performante et rend possible, aujourd'hui, la production en routine d'oligonucléotides.

Figure 17: Les différentes voies de synthèse chimique d'ADN



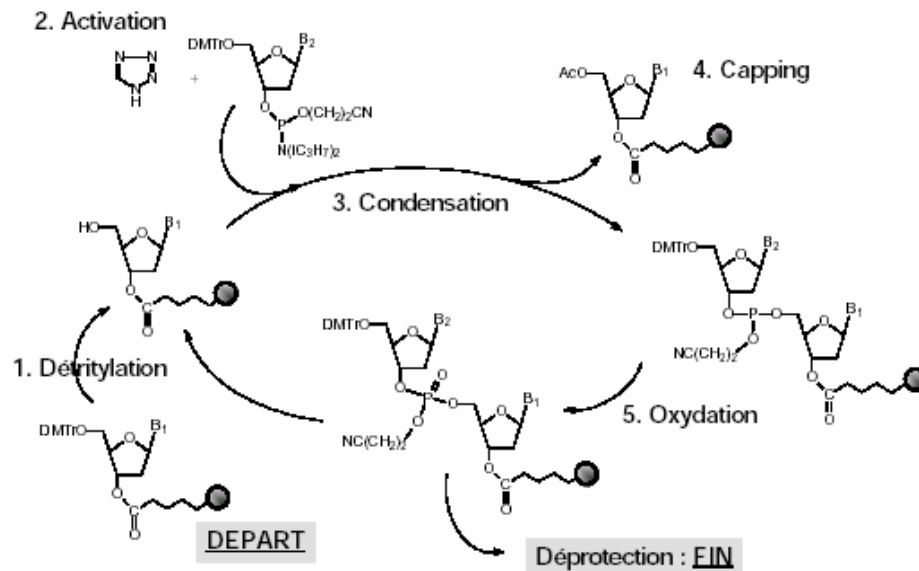
b La synthèse d'oligonucléotides par la méthode au phosphoramidite sur support solide

Cette technique a permis de s'affranchir des étapes d'isolement et de purification des intermédiaires oligonucléotidiques. En effet, le premier nucléoside est fixé par une liaison covalente à un support solide insoluble dans les solvants organiques. Ainsi, l'addition séquentielle des monomères s'effectue sur ce support qui est simplement lavé et séché après chaque cycle afin d'éliminer l'excès des réactifs utilisés.

ü Le cycle de condensation

Le cycle de condensation de la méthode au phosphoramidite est présenté dans la figure suivante :

Figure 18: Cycle de condensation pour la synthèse d'ADN par la voie des phosphoramidites



Il comprend cinq étapes : la détritylation, l'activation couplée à la condensation, le "capping" et l'oxydation. Le premier nucléoside, fixé par sa fonction 3'-OH au support solide (constitué de billes de verre fonctionnalisées par de longues chaînes alkyle aminées), est détritylé par traitement acide (déprotection à l'acide trichloroacétique TCA 3% dans le dichlorométhane) libérant sa fonction alcool primaire 5'-OH. Celle-ci réagit alors avec le motif phosphoramidite du nucléoside suivant, préalablement activé par le tétrazole. Cette étape est appelée condensation. Les fonctions 5'-OH n'ayant pas réagi avec le deuxième nucléoside, ainsi libres, sont masquées par acétylation en présence d'anhydride acétique afin d'arrêter l'élongation des chaînes plus courtes. Cette réaction appelée "capping" facilite la purification des oligonucléotides en fin de synthèse.

L'étape suivante consiste à oxyder le phosphore trivalent en phosphore pentavalent par action d'une solution d'iode 0,1 M. Un nouveau cycle de condensation peut alors recommencer. L'opération est répétée autant de fois qu'il y a de nucléosides à incorporer. Lors du dernier cycle, le groupement diméthoxytrityle terminal est généralement conservé (mode « trityl-on ») car son caractère hydrophobe permet une purification chromatographique plus aisée de l'oligonucléotide.

Ce cycle de synthèse correspond à celui de la synthèse d'oligonucléotides non modifiés. Toutefois l'incorporation de nucléosides modifiés ou de groupements fluorophores nécessite quelques adaptations.

ü Synthèse d'oligonucléotides modifiés par insertion de lésions et groupements fluorophores

Il est d'ordinaire possible d'insérer des nucléosides modifiés lors d'une synthèse sur support. Trois approches sont possibles, incluant les modifications par voie enzymatique, les modifications post-synthétique d'oligonucléotides « normaux », ou encore les modifications introduites par voie chimique. Cette dernière autorise une souplesse de synthèse que ne procurent pas les deux premières méthodes. En effet, elle permet la préparation d'un synthon phosphoramidite dérivé du nucléoside modifié que l'on souhaite insérer. Celui-ci est utilisé en synthèse automatisée sur support solide afin d'assembler des oligonucléotides comportant une ou plusieurs modifications en des sites définis. Avant d'entreprendre ces synthèses, il est nécessaire d'étudier la stabilité du nucléoside modifié, souvent plus fragile que les nucléosides naturels, dans les conditions rencontrées lors de la synthèse en phase solide. Ces études préalables sont indispensables afin de déterminer le degré de compatibilité du dommage avec la chimie du phosphoramidite et de mettre en place un système de protection adapté.

2. Séquence des oligonucléotides d'intérêt

Parmi les lésions à étudier, notre choix s'est principalement porté vers la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, l'uracile et le glycol de thymine. Les deux premières lésions sont disponibles commercialement sous forme de synthon phosphoramidite et leur stabilité a déjà été démontrée (cf. site Internet Société Glen Research). Leur incorporation au sein de la séquence n'a posé aucun obstacle chimique, permettant ainsi d'utiliser le cycle classique précédemment décrit. La lésion glycol de thymine a été synthétisée au laboratoire (Gasparutto *et al.*, 2005) et le synthon phosphoramidite a également pu être inséré par la méthode classique de synthèse d'oligonucléotides en utilisant des conditions de déprotection finale douces¹.

¹ Les produits utilisés pour la synthèse oligonucléotidique (solvants, supports, réactifs et synthons modifiés et normaux) selon la méthode aux phosphoramidites sont d'origine commerciale (Applied Biosystems, Fostercity, USA ; Glen Research, Sterling, USA) à l'exception du synthon diol de thymine (Gasparutto, D., Cognet, S., Roussel, S., & Cadet, J. (2005) Synthesis of a convenient thymidine glycol phosphoramidite monomer and its site-specific incorporation into DNA fragments. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 1831-42.). Les différents synthons phosphoramidites ont été mis en solution dans de l'acétonitrile anhydre. La synthèse a été effectuée à l'échelle 1 µmole sur un synthétiseur Applied Biosystems 392 (Applied Biosystems, Fostercity, USA) en conservant le groupement 4,4'-diméthoxytrytile terminal. Les temps de réaction de couplage sont environ de 30 secondes par synthon et sont augmentés pour l'insertion de synthons modifiés. La réaction de détrytilation est effectuée à chaque cycle avec une solution de TCA à 2% dans CH₂Cl₂. L'étape d'oxydation est effectuée avec une solution d'iode 0,02 M dans un mélange de solvants eau/pyridine/THF. L'étape de « capping » est effectuée en traitant le brut de synthèse par une solution d'anhydride phénoxyacétique et de méthyle imidazole dans du THF.

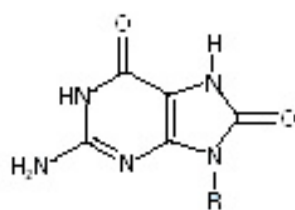
Nous avons également décliné les structures en adjoignant à celles-ci des groupements fluorophores à leurs extrémités 5' et 3'. En effet, lors de la synthèse sur support, les billes de silice CPG (Controlled Pore Glass) représentant l'extrémité 3' de l'oligonucléotide ont été greffées avec un des deux fluorophores d'intérêt : le quencher Dabcyl (4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoic acid, succinidimil ester). Ainsi, on a pu insérer en 5' des fluorochromes, sous forme de nucléosides phosphoramidites substitués par des fluorophores, tels que la fluorescéine sous forme fluorescéine-dT (FLUO) ou encore la rhodamine (TAMRA). Enfin, un dernier cycle de couplage a permis l'insertion d'un nucléoside terminal, possédant une extrémité 5' hydroxyle libre afin d'autoriser les marquages par [³²-P] et l'analyse par électrophorèse. Plusieurs séquences ont été synthétisées, en "hairpin" ou linéaires. Le tableau suivant présente l'ensemble des séquences préparées et utilisées au cours de ce travail ainsi que la structure des lésions insérées (cf. Figure 19A et Figure 19B).

Figure 19A: Structure des différents oligonucléotides synthétisés

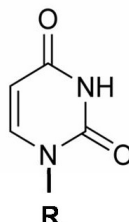
Nom	Séquence (5'-3')	Lésion
<u>Série Fluorescéine</u>		
Hairpin dGuo Fluo	5'-T-Fluorescéine-TTCGGACCGTGACTTTT Dabcyl-3'-AAGCCTGGCACTGATTTT	dGuo/G
Hairpin 8oxodGuocFluo	5'-T-Fluorescéine-TTCGGACCGTGACTTTT Dabcyl-3'-AGCCTOGCACTGATTTT	8-oxodGuo (O)
Hairpin Tg Fluo	5'-T-Fluorescéine-TTCGGGA A CGTGACTTTT Dabcyl-3'-AGCCTTgGCACTGATTTT	Thd glycol (Tg)
Hairpin dUrd Fluo	5'-T-Fluorescéine-TTCGGAGCGTGACTTTT Dabcyl-3'-AGCCTUGCACTGATTTT	dUrd (U)
<u>Série Rhodamine</u>		
Hairpin Tg Rhod	5'-T-Rhodamine-TTCGGGA A CGTGACTTTT Dabcyl-3'-AGCCTTgGCACTGATTTT	Thd glycol (Tg)
Hairpin dUrd Rhod	5'-T-Rhodamine-TTCGGAGCGTGACTTTT Dabcyl-3'-AGCCTUGCACTGATTTT	dUrd (U)
<u>Séquences linéaires Fluorescéine</u>		
20-mère 5'Fluo linéaire	5'-T-Fluorescéine-GG ACT TC G AGC AAG AGA TC-3'	dGuo/G
20-mère 5'Fluo 8oxodGuo	5'-T-Fluorescéine-GG ACT TC O AGC AAG AGA TC-3'	8-oxodGuo (O)
<u>Séquence linéaire complémentaire</u>		
20-mère 3'Dabcyl	Dabcyl-3'-ACC TGA AG C TCG TTC TCT AG-5'	dCyt/C

Figure 19 B : Structure des lésions insérées dans les oligonucléotides de synthèse

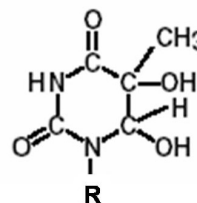
8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua)



Uracile (Ura)



Glycol de Thymine (Tg)



R= 2-désoxyribose

C. Purification des mélanges bruts de synthèse

Une fois déprotégés et libérés de leur support (CPG), ces oligonucléotides ont été purifiés, une première fois par électrophorèse et ombrage UV. La récupération des bandes d'intérêt nécessite plusieurs cycles d'élution et d'extraction du gel avec de l'eau. Une étape finale de dessalage sur colonne d'exclusion est ensuite effectuée². La pureté des fractions obtenues a ensuite été contrôlée par chromatographie liquide haute performance (CLHP)³ et électrophorèse sur gel de polyacrylamide (EGPA) après marquage au [³²P].

Les Figures 20A et B présentent deux profils d'élution chromatographique de l'oligonucléotide portant la lésion glycol de thymine, marqué par la rhodamine (Figure 20A) ou la fluorescéine en 5' (Figure 20B) et par le Dabcyl en 3'. Tous les oligonucléotides ont été analysés par le même gradient d'élution, et par la même méthode.

2 Déprotection des oligonucléotides

Les supports solides sont transférés dans des tubes eppendorf à bouchon vissé et incubés dans 1 ml d'ammoniaque concentrée (32 %), sous agitation et à température ambiante pendant 5 h. Le mélange brut de déprotection est alors évaporé sous pression réduite. Chaque oligonucléotide en solution est quantifié par spectroscopie UV. Les oligonucléotides sont ensuite purifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant puis dessalés sur colonne d'exclusion NAP (Pharmacia, Uppsala, Suède) avant une purification finale par CLHP sur colonne de phase inverse C18. Les oligonucléotides purifiés sont quantifiés par spectroscopie UV et analysés par spectrométrie de masse MALDI-ToF.

3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La purification et l'analyse des oligonucléotides sont effectuées sur la même colonne.

Système de purification : Colonne Uptisphere C18 (300 Å, 250 mm x 4,6 mm) en mode gradient. Eluant : TEAA (acétate de triéthyle ammonium) 10 mM et un gradient d'acétonitrile de 5 à 25 % en 45 min. Débit : 1 ml/min.

Système analytique : Colonne Uptisphere C18 (300 Å, 250 mm x 4,6 mm) en mode gradient. Eluant : TEAA 10 mM et un gradient d'acétonitrile de 17 à 25 % en 20 min. Débit : 1 ml/min.

Figure 20: A : Profil d'élution chromatographique du Diol Rhodamine ("hairpin" Tg marqué par la rhodamine) détection UV à 260 nm

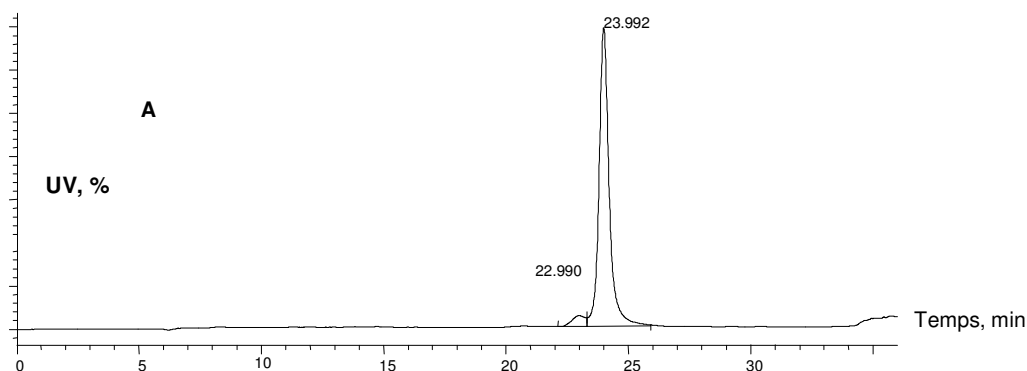
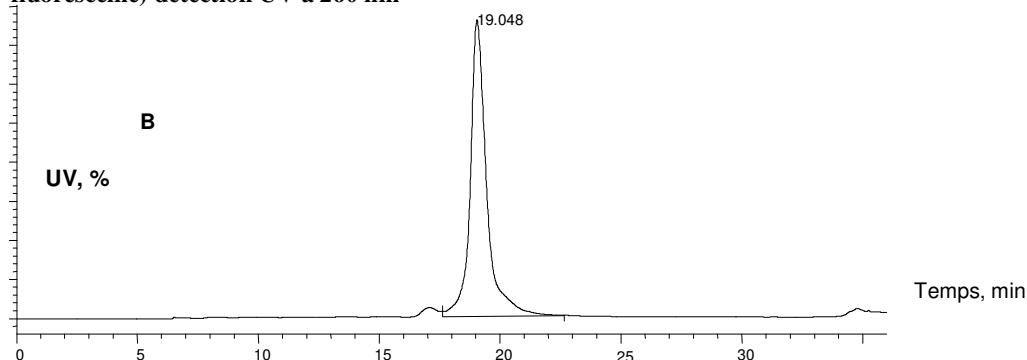


Figure 20 B : Profil d'élution chromatographique du Diol Fluorescéine ("hairpin" Tg marqué par la fluorescéine) détection UV à 260 nm

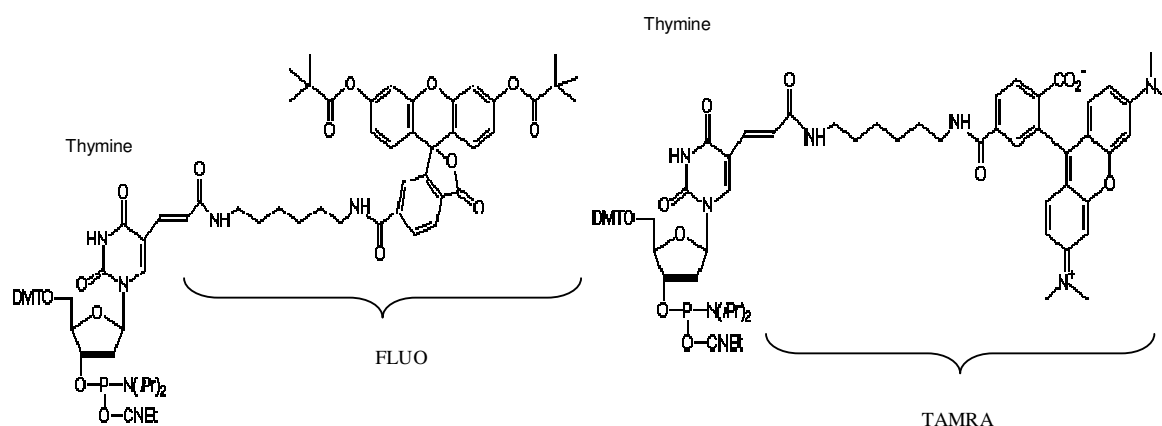


Sur chacun des profils, on obtient un pic très majoritaire (>90 %) prouvant la pureté des sondes synthétisées. On peut noter la différence significative dans les temps de rétention des séries rhodamine et fluorescéine, malgré une structure nucléotidique identique. En effet, la structure (cf. Figure 21) des deux fluorochromes diffère au niveau des groupements substituant les cycles aromatiques. Cette caractéristique permet une élution spécifique des deux sondes oligonucléotidiques. La séparation par analyse sur colonne en C18, colonne sur laquelle s'adsorbent plus fortement les composés les plus hydrophobes, conduit à une rétention plus grande de la sonde TAMRA. Cette sonde est donc éluee plus tardivement que la sonde portant le groupement FLUO.

Figure 21: Structure comparée des deux groupements chromophores sur le synthon 2'-désoxythymidine

FLUO-dT

TAMRA-dT



D. Analyse par spectroscopie d'absorption des sondes contrôle et modifiées

Une fois purifiés, les solutions sont quantifiées, en solution dans l'eau, par spectroscopie d'absorption UV. La Figure 22 présente les spectres d'absorption UV des oligonucléotides linéaires et "hairpin" utilisés dans cette étude.

Figure 22 A : Spectre d'absorption de l'oligonucléotide linéaire 5'Fluo 8-oxodGuo

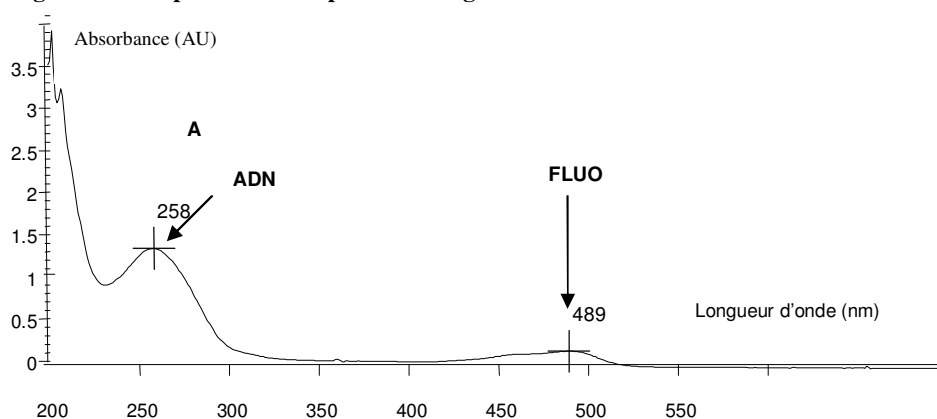


Figure 22 B : Spectre d'absorption de l'oligonucléotide "hairpin" dGuo Fluo

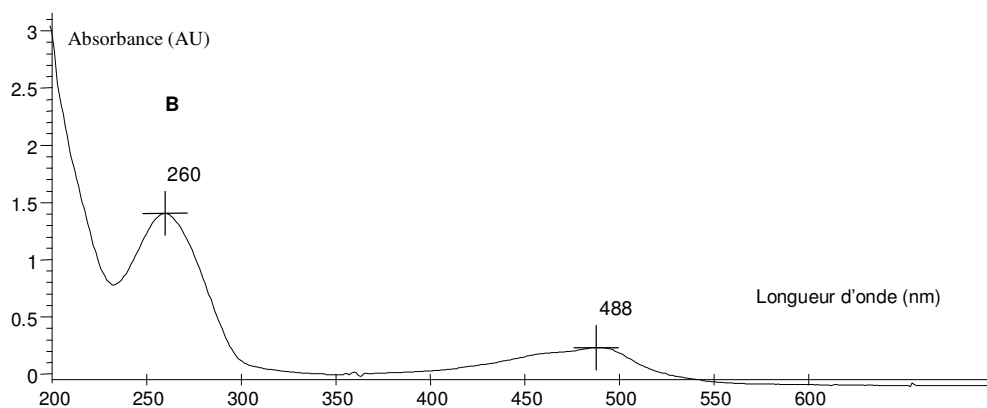


Figure 22 C : Spectre d'absorption de l'oligonucléotide "hairpin" dUrd Fluo

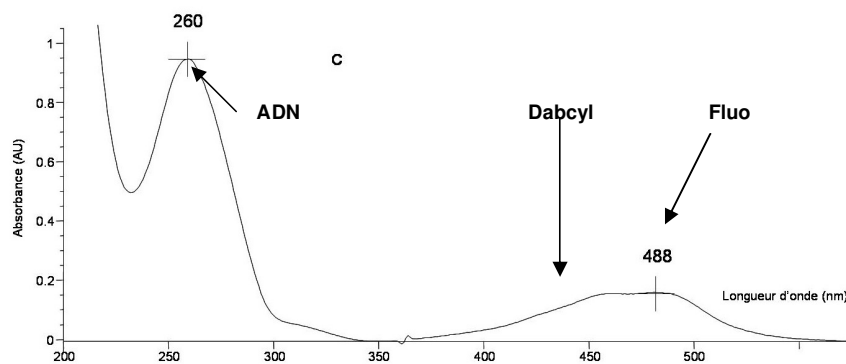


Figure 22 D : Spectre d'absorption de l'oligonucléotide "hairpin" 8oxodGuo Fluo

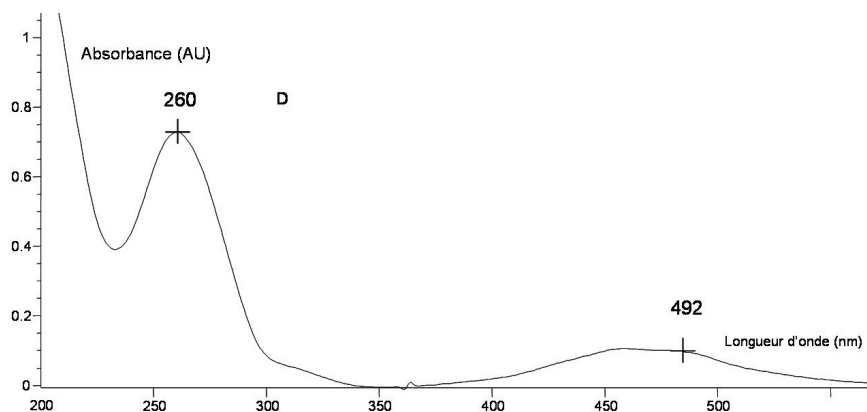
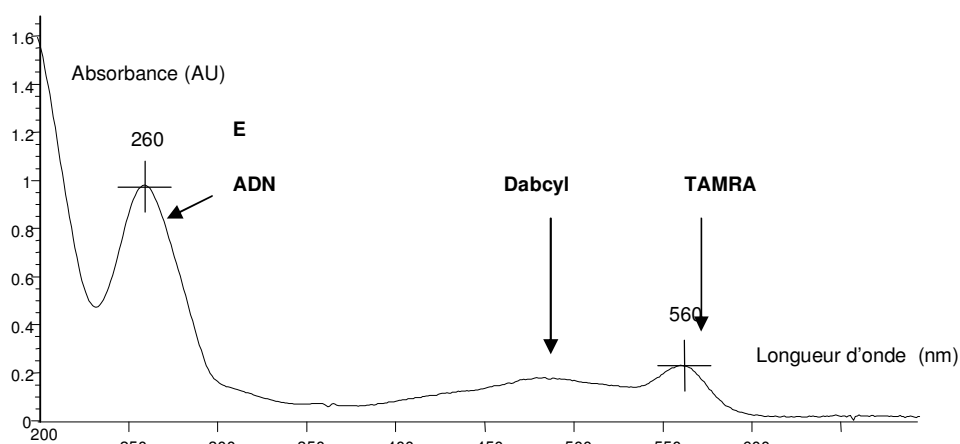


Figure 22 E : Spectre d'absorption de l'oligonucléotide "hairpin" dUrd Rhodamine



On note la présence dans ces spectres de deux pics prédominants : un à 260nm correspondant au maximum d'absorption UV de l'ADN ainsi qu'un second culminant à la longueur d'onde d'excitation spécifique du fluorochrome employé (492 nm pour la fluorescéine FLUO ; 559 nm pour la rhodamine TAMRA). La présence de ces pics confirme l'insertion des synthons fluorescents durant la synthèse chimique sur support. De plus, la présence d'un épaulement entre 400 et 500 nm (entre 450 et 470 nm) confirme de même l'insertion du Dabcyl au sein de l'oligonucléotide.

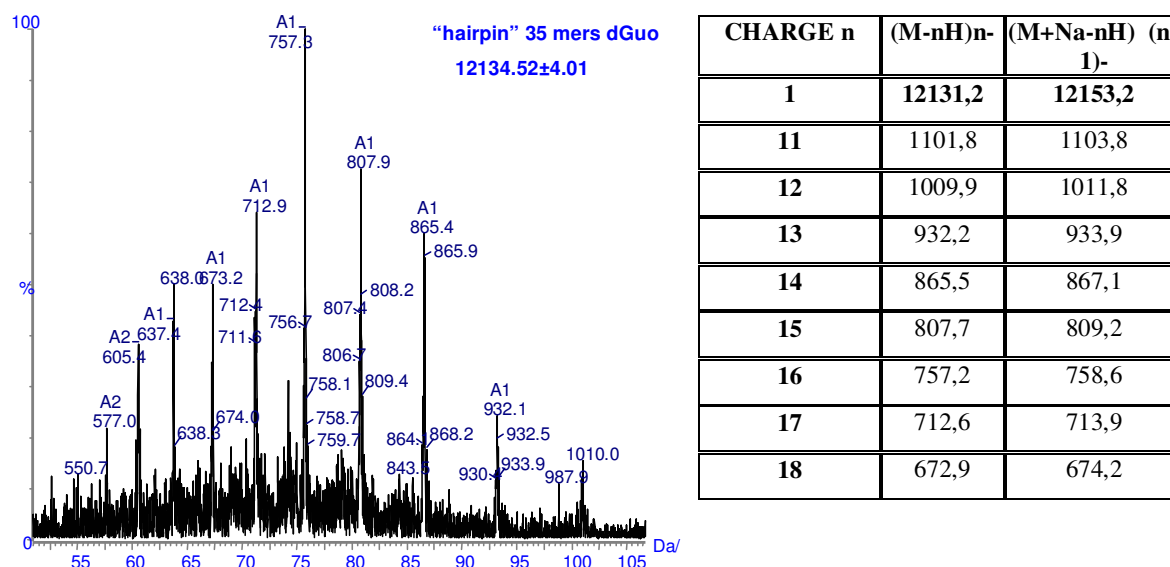
E. Caractérisation des oligonucléotides

Afin de vérifier les structures respectives des différents oligonucléotides synthétisés, ces derniers ont été analysés par plusieurs méthodes complémentaires.

1. Analyse par spectrométrie de masse

Tout d'abord, les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse en mode d'ionisation par « electrospray » (IES-MS). La Figure 23 représente le spectre obtenu pour la sonde hairpin 35-mère dGuo Fluo ainsi que le tableau de correspondance des masses trouvées pour les fragments.

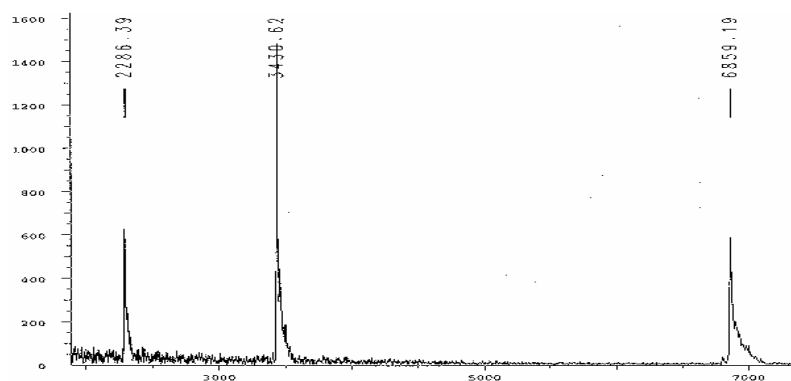
Figure 23 : Spectre de masse de "l'hairpin" dGuo Fluo



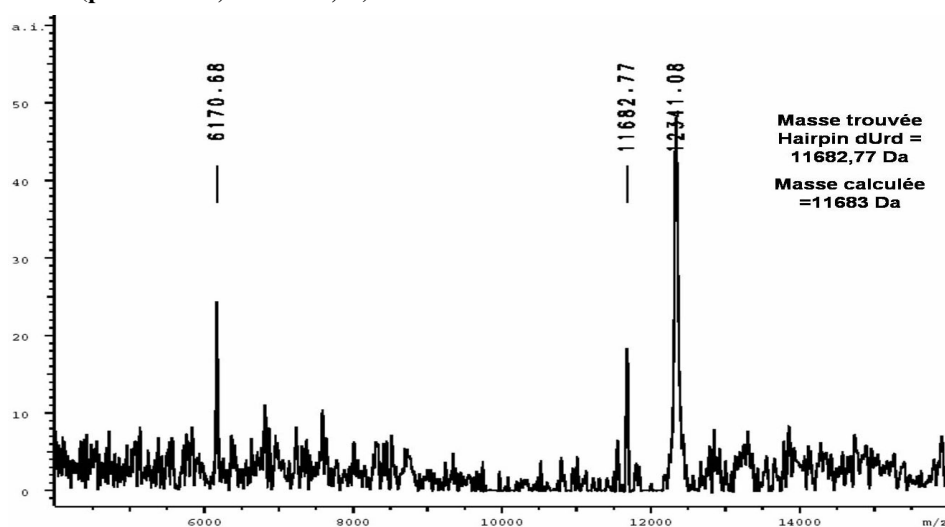
La prise en compte des différents états de charge trouvés par déconvolution permet d'accéder au poids moléculaire de l'oligonucléotide étudié. Toutefois, les quantités nécessaires relativement importantes pour l'analyse par ESI-MS (environ 100 picomoles pour une "hairpin" de 35 bases de long dans un volume total de 20 µl), ont orienté nos méthodes de caractérisation en masse vers l'analyse par MALDI-ToF.⁴ Les quantités requises sont 5 à 10 fois moins importantes que pour une analyse par ESI-MS, et on peut détecter l'ion pseudo-moléculaire (impossible en ESI pour des oligonucléotides supérieurs à 10/15 bases de long). Les figures 24A et 24B présentent les résultats obtenus pour certains de nos substrats, analysés par MALDI-ToF.

⁴ Les spectres de masse MALDI-ToF (désorption et ionisation laser assistées par matrice en association à un analyseur de temps de vol) ont été obtenus sur un appareil Biflex (Brucker, Wissenbourg, France). La matrice est constituée d'acide 3-hydroxypicolinique (35 mg) dissout dans 1 ml d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium (100 µM). L'échantillon, constitué de 50 pmol d'oligonucléotide, est dissout dans 1 ml d'eau désionisée. Une fraction de 1 µl de cette solution à analyser est déposée avec 1 µl de matrice sur la cible et l'ensemble est laissé à l'air libre afin de sécher. Pour certaines analyses effectuées sur de faibles quantités de matériel, on peut concentrer l'échantillon en utilisant des supports « Zip-Tip » de dessalage (Waters, France). Les spectres sont enregistrés à partir de 40 impulsions laser, les ions étant accélérés avec une tension d'extraction de 19 kV. L'instrument est préalablement calibré avec une solution d'oligonucléotide de masse connue. L'échantillon est désorbé par bombardement laser. Le parcours (ou temps de vol) des ions dans le détecteur est directement proportionnel à leur masse, ce qui autorise leur caractérisation

Figure 24:A Spectre de masse MALDI-ToF de l'oligonucléotide linéaire 5'FluodGuo en mode négatif



B : Spectre de masse MALDI-ToF de l'oligonucléotide "hairpin" dUrd en mode négatif en présence d'un calibrant interne (pics à 12341,08 et 6170,68)



L'analyse en masse a été effectuée pour tous les oligonucléotides synthétisés. Le pic m/z expérimental est en accord avec la masse calculée des fragments d'ADN et ceci pour tous les substrats précédemment mentionnés. La pureté et l'intégrité des sondes est alors confirmée.

2. Vérification de l'insertion des lésions au sein des sondes nucléiques par analyse EGPA

Les oligonucléotides ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (EGPA) après marquage radioactif⁵ et incubation en présence d'ADN *N*-glycosylsases⁶ spécifiques afin de vérifier la bonne insertion des lésions d'intérêt.

A ces fins⁷, les duplex 5'Fluo dGuo/3'-dCyt Dabcyl et 5'Fluo 8-oxodGuo/3'dCyt Dabcyl ont chacun été marqués par du [³²P] puis traités par des enzymes spécifiques de la lésion d'intérêt, ici la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, reconnue préférentiellement par Fpg ou son homologue eucaryote la protéine OGG1. La même procédure a été appliquée aux oligonucléotides "hairpins" (marquage radioactif et traitement par l'enzyme spécifique). « L'hairpin » dUrd a été incubée avec un mélange d'UNG et de Fpg ; les "hairpins" Tg Fluo et Tg Rhod ont été traitées par l'endonucléase III et l'"hairpin" 8-oxodGuo par la Fpg. Les figure 25 et figure 26 montrent l'analyse par EGPA de ces différents substrats, ainsi que les produits obtenus, après une incubation d'une durée de 45 minutes en présence des enzymes spécifiques de chaque lésion et pour chaque oligonucléotide. La migration des produits obtenus au niveau d'un 8-mère pour le duplex 5'Fluo 8oxodGuo/3'dCyt Dabcyl et d'un 29-mère pour les "hairpins" sont en accord avec la structure de ces derniers.

⁵ 10 à 40 pmol d'oligonucléotide sont dissous dans 6,5 µl d'eau. On ajoute ensuite 1 µl de [³²P] ATP (25 µl à 250 µCi / µl Amersham Biosciences, Orsay, France), 2,5 µl de tampon enzymatique 4X et 1 unité de T4 polynucléotide kinase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le mélange réactionnel est incubé durant 1 h à 37 °C, puis les oligonucléotides sont purifiés sur une colonne d'exclusion de type G-25 « microspin » (Amersham Biosciences, Orsay, France).

⁶ Les oligonucléotides (1 pmol) préalablement marqués à leur extrémité 5' au [³²P], sont mis en présence de concentrations croissantes de glycosylases (ou de la nucléase P1 0,02 U) en solution dans le tampon enzymatique 1X précédemment décrit. Le volume final de réaction est 10 µl. L'incubation de l'enzyme en présence du substrat est effectuée pendant 40 min. En fin de réaction, un mélange de « bleu formamide » (Bleu de bromophénol 0,025 %, xylène cyanol 0,025 %, EDTA 0,5 mM et formamide 95 %) est ajouté. L'ensemble est porté à 90 °C pendant 3 minutes avant d'être déposé sur gel de polyacrylamide à 15 % dénaturant (urée 8 M).

⁷ Les enzymes purifiées, Fpg, Alk A, Endo III d'*E. Coli*, yOgg1 de *S. Cerevisiae* ont été fournies par le Dr Serge Boiteux (CEA/Fontenay-aux-Roses, France).

L'enzyme UNG est d'origine commerciale (Invitrogen, France).

L'inhibiteur de l'UNG (UGi) a été fourni par le Pr Wim Burmeister (IVMS, EMBL, Grenoble, France).

La nucléase P1 provient de chez Sigma (St Quentin-Fallavier, France).

Les réactions enzymatiques en présence des glycosylases mentionnées (Fpg : 2,6 µg/µl ; Endo III : 2,2 µg/µl, yOgg1 : 1,7 µg/µl, UNG : 2 U/µl) sont effectuées dans un tampon 1 X composé de 25 mM Tris-HCl, 2 mM Na₂EDTA et 50 mM NaCl, pH 7,6. Les réactions enzymatiques de digestion par la nucléase P1 (0,2 U/µl) se font également dans ce tampon.

Figure 25: Analyse EGPA des duplex

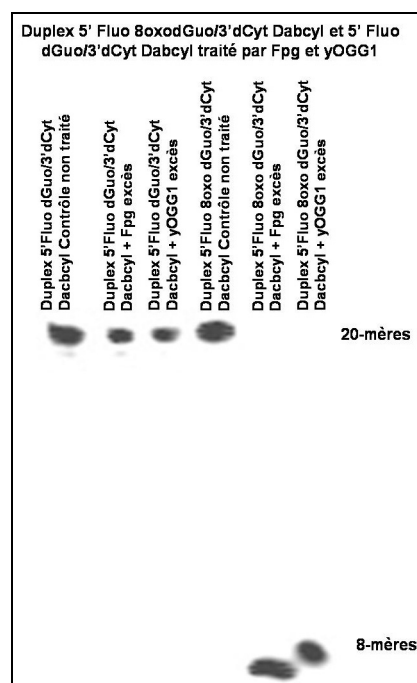
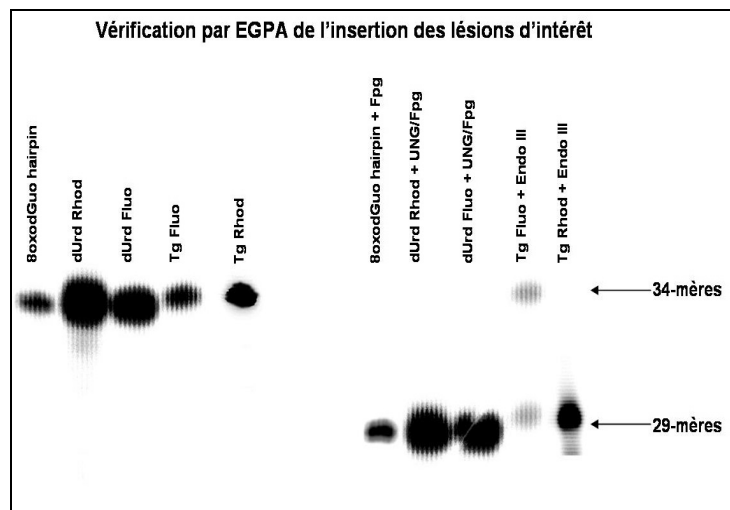


Figure 26: Vérification de l'insertion des lésions



Cette analyse met en exergue quelques principes fondamentaux à prendre en compte dans notre étude. On confirme premièrement que les “hairpins” sont spécifiquement reconnus par les glycosylases en charge des lésions insérées, confirmant que ce sont de bons substrats pour les enzymes. De plus, on peut noter la légère différence de migration du fragment issu de la digestion par la Fpg du duplex 5’-Fluo8oxodGuo/3’-dCyt Dabcyl par rapport au produit de digestion issu du traitement par la yOGG1. En effet, cette différence dans la migration des fragments libérés correspond au fait que le mécanisme d’action entre les deux enzymes utilisées diffère : $\beta\delta$ élimination pour la Fpg libérant les extrémités des fragments sous forme 3’-OH et 5’-P ; β élimination pour la yOGG1 libérant une extrémité sous forme de 3’ aldéhyde (et non 3’-OH) et un 5’-P, générant un fragment de masse plus importante, donc migrant moins loin dans le gel). Cette différence dans les mécanismes est parfaitement établie comme cela est référencé dans de nombreuses publications (Boiteux & Radicella, 2000)

Une fois structuralement identifiés, les oligonucléotides ont été étudiés et caractérisés pour leurs propriétés de fluorescence, afin de rétablir et compléter les données déjà issues de l’analyse par EGPA.

II. Caractérisation des substrats oligonucléotidiques par fluorescence

Les oligonucléotides utilisés dans cette étude ont tous été modifiés par insertion de groupements fluorophores à leurs extrémités 3' (présence d'un groupement Dabcyl) et 5' (soit par la fluorescéine soit par la rhodamine). Ainsi, en solution, les propriétés spectrales de ces groupements fluorophores vont permettre l'identification spécifique des oligonucléotides de cette étude⁸.

A. Linéarité du signal détecté

La linéarité de la réponse fluorescente a été étudiée avec des échantillons d'oligonucléotide 5'Fluo dGuo linéaire (20-mère) pour différentes concentrations (500 nM ; 1 μ M ; 1,5 μ M ; 2,5 μ M ; λ_{ex} = 492 nm). Les Figure 27 et Figure 28 représentent les spectres de fluorescence recueillis à 525 nm pour ces différentes concentrations (figure 27) ainsi que l'excellente linéarité de la réponse (figure 28).

Figure 27: Spectres de fluorescence de la sonde linéaire 5' Fluo dGuo: Linéarité du signal fluorescent

Figure 28: Corrélation linéaire entre fluorescence et concentration de sonde linéaire 5'Fluo dGuo

Figure 27

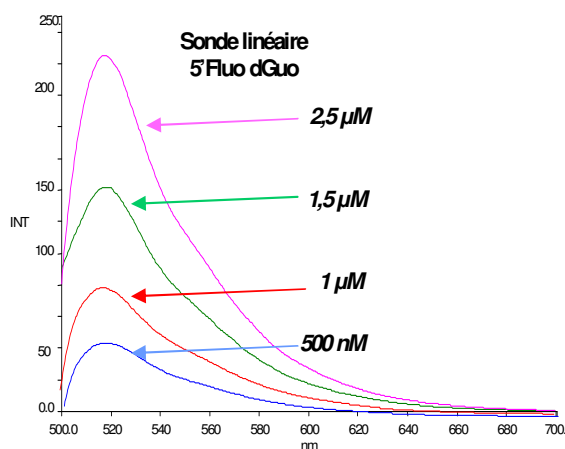
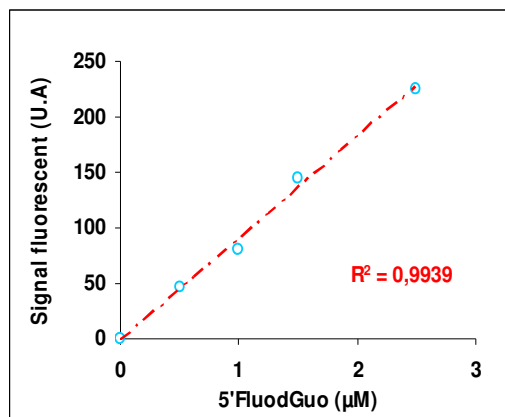


Figure 28



⁸ Les oligonucléotides (généralement 10 pmol) sont mis en solution dans un volume réactionnel final de 100 μ l, composé de 75 μ l d'eau désionisée et 25 μ l de tampon enzymatique 4X. Les enzymes étudiées sont mises à incuber dans ce mélange réactionnel à la concentration désirée et l'ensemble est transféré dans une cuve en quartz pour lecture de fluorescence sur le spectrofluorimètre LS 50 B (Perkin Elmer), préalablement thermostaté à 37°C à l'aide d'un bain-marie externe. La lecture de fluorescence se fait après excitation à 492 nm pour le FLUO ou 559 nm pour le TAMRA. L'émission est recueillie à 520 nm pour le FLUO et 580 nm pour le TAMRA. Les mélanges réactionnels peuvent aussi être analysés sur microplaque (à fond noir 96 puits spécial fluorescence, Perkin Elmer) à l'aide du lecteur microplaque VICTOR 3, thermostaté à 37°C. Le signal de fluorescence est traité par le logiciel de traitement de signaux Wallac 1420 (Perkin Elmer). L'ensemble est calibré aux mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission que le spectrofluorimètre LS 50 B.

L'efficacité de détection de fluorescence a ensuite été déterminée pour les "hairpins". Pour cela, ces derniers ont été mis en solution à différentes concentrations et leur signal fluorescent a été évalué puis comparé à celui de la sonde linéaire non quenchée. Les Figure 29A et B mettent en évidence la capacité du Dabcyl, positionné proche du fluorophore sur une sonde en "hairpin", à éteindre le signal de la fluorescéine à 525 nm d'environ 80 à 90%, valeurs confirmées par la littérature (Marras *et al.*, 2002) et ceci sur deux types différents d'appareils de détection.

Figure 29A: Comparaison de la fluorescence de la sonde linéaire 5'Fluo dGuo par rapport aux sondes "hairpin" dGuo Fluo et 8-oxodGuo Fluo ; détection sur Spectrofluorimètre LS 50B (Perkin-Elmer, Fig. A)

Figure 29B : Comparaison de la fluorescence de la sonde linéaire 5'Fluo dGuo par rapport aux sondes "hairpin" suivies par lecteur Stratagène (Fig. B)

Figure 29A

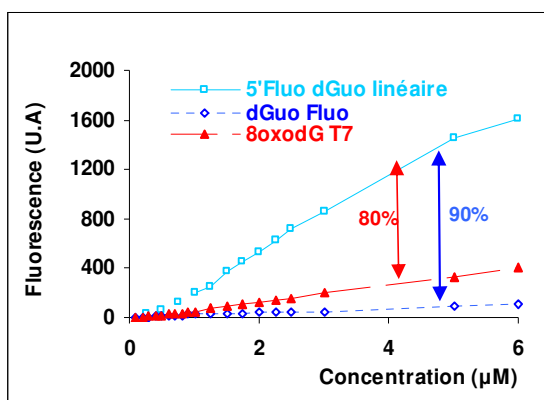
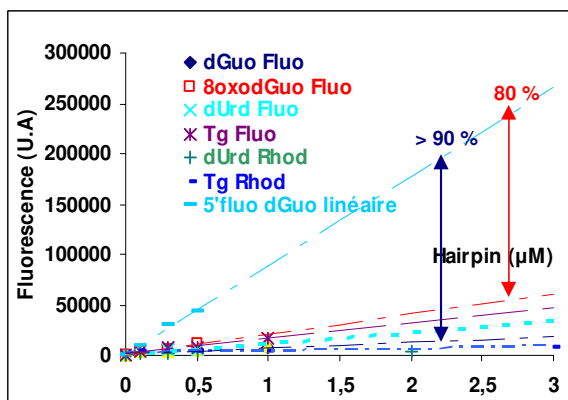


Figure 29B



B. Confirmation de l'insertion spécifique des groupements chromophores

1. Par analyse spectrale

Tous les substrats réagissent spécifiquement en fonction des fluorophores greffés. Pour chaque oligonucléotide, une fiche « d'identité » spectrale, regroupant ses caractéristiques propres, a été établie. Nous avons procédé à l'établissement de spectres d'excitation (à longueur d'onde d'émission fixée) ou de spectres d'émission (à longueur d'onde d'excitation fixée) et avons corroboré les données théoriques de chaque longueur d'onde (excitation et émission) pour les fluorophores insérés.

On rapporte dans les figures 30, 31 et 32 les spectres d'excitation et d'émission pour l'oligonucléotide 5'Fluo dGuo linéaire (100 nM), la sonde dUrd Fluo (1 μM) et la sonde dUrd

Rhod (100 nM). Pour le spectre d'excitation (dont la longueur d'onde d'émission est fixée arbitrairement à 525 nm, λ_{em} théorique du FLUO-dT), l'intensité maximale du spectre est observée à 492 nm, ce qui correspond au λ_{ex} théorique du FLUO-dT. De la même façon, le spectre d'émission montre une intensité de fluorescence maximale à 525 nm ou 580 nM, pour une λ_{ex} fixée à 492 nm ou 559 nm, ce qui est en accord avec la valeur du λ_{em} théorique du FLUO-dT et du TAMRA-dT. Ceci confirme a posteriori la bonne insertion du fluorophore d'intérêt ainsi que son intégrité.

Figure 30: Spectres d'excitation et d'émission de la sonde 5'FluodGuo (100 nM)

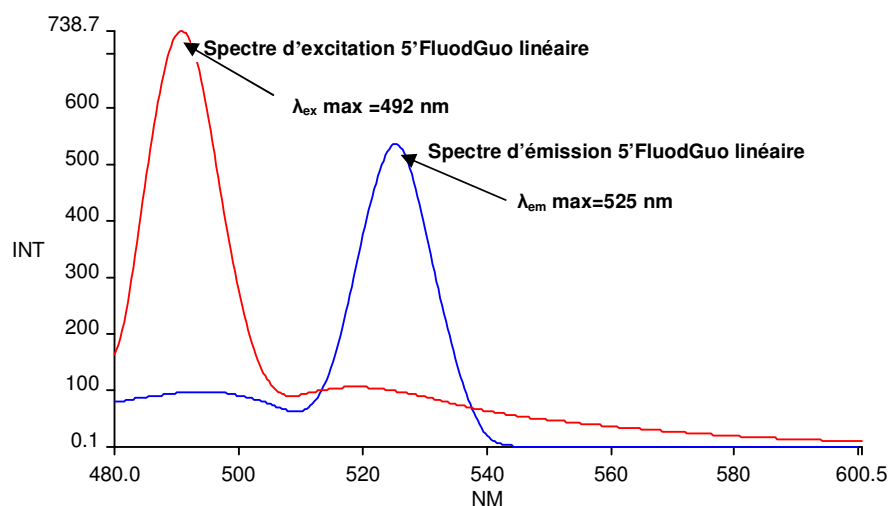


Figure 31 : Spectres d'excitation et d'émission de la sonde dUrd Fluo (1 μ M)

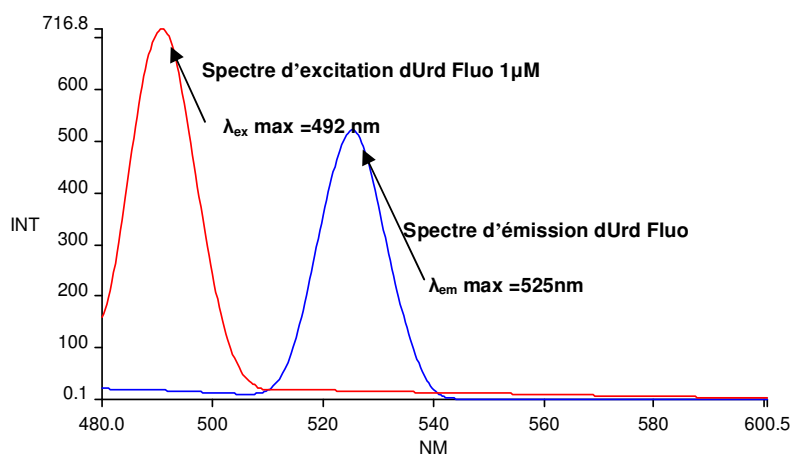
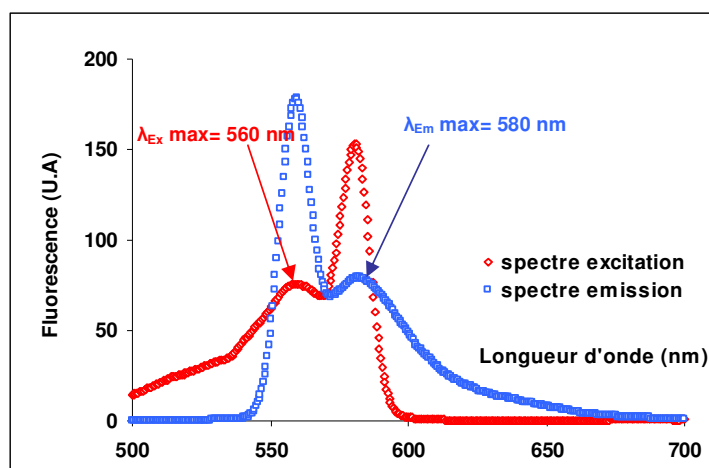


Figure 32: Spectres d'excitation et d'émission de la sonde dUrd Rhod (100 nM)



On note donc l'apparition d'un pic d'excitation spécifique pour la fluorescéine et la rhodamine à 492 et 560 nm respectivement, ainsi qu'un pic d'émission pour la fluorescéine et la rhodamine à 525 et 580 nm. Ces valeurs sont en parfait accord avec les données théoriques des fluorophores utilisés. Ceci confirme que ces derniers ont par conséquent bien été intégrés dans la séquence oligonucléotidique. On peut aussi conclure sur la base des fortes efficacités de quenching observées que les structures sont bien repliées en structure "hairpin" dans ces conditions expérimentales (décrites dans la partie expérimentale). Cette propriété structurale d'autocomplémentarité confère aux "hairpins" une possibilité supplémentaire de caractérisation (leur température de fusion ou T_m est en effet caractéristique de leur séquence).

2. Par vérification du « quenching » de fluorescence sur les sondes linéaires : Evolution de fluorescence d'un oligonucléotide linéaire simple brin fluorescent hybridé à son brin complémentaire portant un « quencher »

Une solution d'oligonucléotide simple brin 5'Fluo dGuo linéaire est mise en présence de quantités croissantes d'oligonucléotide complémentaire, lui aussi linéaire et simple brin : le 3'dCyt Dabcyl. La fluorescence est suivie par spectrofluorimétrie ou à l'aide d'un lecteur microplaque. Les Figure 33 et Figure 34 montrent respectivement les spectres de fluorescence recueillis au cours de l'expérience d'hybridation ainsi que les courbes d'extinction de

fluorescence en fonction de la quantité de sonde complémentaire ajoutée. La Figure 35 illustre cette même relation, détectée sur le lecteur microplaque.

Figure 33: Spectres de fluorescence reflétant l'évolution de fluorescence de 50 nM 5'Fluo dGuo linéaire en présence de son complémentaire 3'dCyt Dabcyl

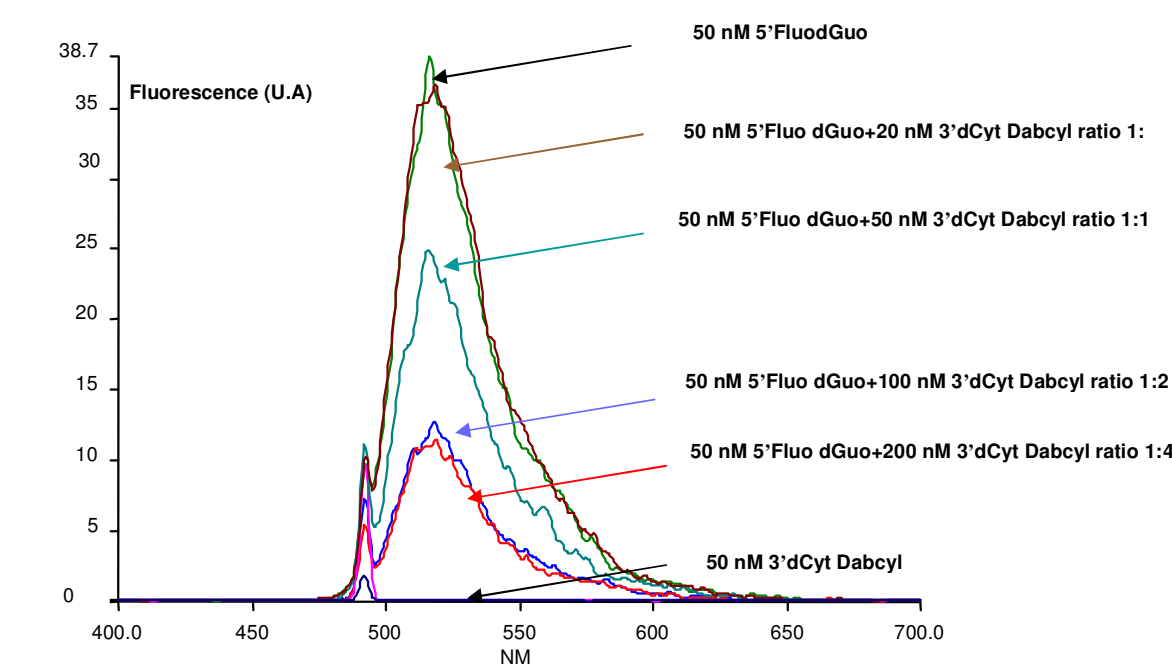


Figure 34: Evolution du quenching de fluorescence de la sonde linéaire 5'Fluo dGuo en fonction de la quantité de sonde complémentaire ; suivi à l'aide du fluorimètre LS 50 B

Figure 35 : Evolution du quenching de fluorescence de la sonde linéaire 5'Fluo dGuo en fonction de la quantité de sonde complémentaire ; suivi par lecteur microplaque Victor 3)

Figure 34

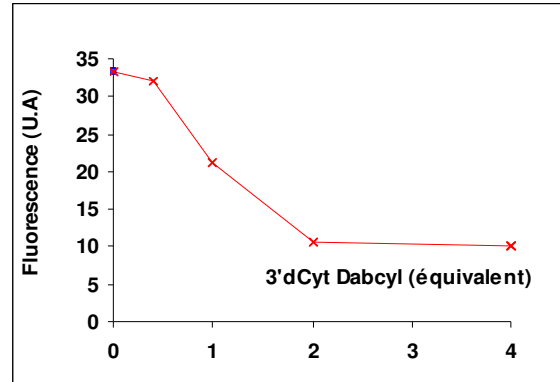
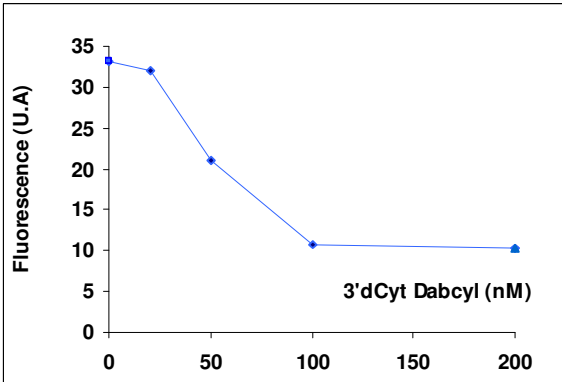


Figure 35



La Figure 33 montre tout d'abord l'évolution des spectres de fluorescence en fonction de doses croissantes d'oligonucléotide complémentaire additionnées. Les valeurs des pics de fluorescence

maximale à 525 nm diminuent de façon corrélée à l'augmentation de la concentration d'oligonucléotide complémentaire, sans toutefois obtenir une extinction totale de fluorescence du milieu. L'inhibition de fluorescence n'est jamais totale (Figure 34 et Figure 35), même quand le brin complémentaire est en fort excès (4 équivalents). Le « quenching » final atteint dans les deux cas une valeur de l'ordre de 70%. Une explication pour cette observation réside dans le fait que les capacités de « quenching » du dabcyI sont généralement limitées à $\approx 80\%$ d'inhibition de fluorescence pour le FLUO. D'autre part, la formation du duplex n'est pas quantitative dans ces conditions. Toutefois, cette expérience montre clairement qu'il est possible de détecter une diminution de fluorescence provoquée par l'hybridation avec un fragment complémentaire marqué par le DabcyI. Les sondes linéaires ont donc bien intégrées les groupements fluorophores.

3. Par détermination des températures de fusion des sondes «hairpins»

La température de fusion d'un oligonucléotide double brin est la valeur pour laquelle 50 % des ADN sont sous forme simple brin et 50 % sous forme double brin. Appliqué à nos «hairpins», la température de fusion correspond au point d'inflexion de la courbe obtenue en suivant l'évolution de la fluorescence en fonction de la température. Ainsi, ce point d'inflexion représente 50% de forme «hairpin» ouverte ou déshybridée.

Nous rapportons dans les Figure 36 et Figure 37 les courbes de fusions obtenues sur quelques «hairpins» ainsi qu'un tableau récapitulatif (Figure 38) des T_m pour chaque substrat après mesure sur deux appareils au format de détection et de lecture différents.

Figure 36: Courbes de fusion des sondes « hairpin » dGuo Fluo et 8-oxodGuo Fluo suivies sur Spectrofluorimètre LS 50B (Perkin Elmer) ; Volume de lecture 100 μ l

Figure 37: Courbes de fusion des sondes « hairpin » dGuo Fluo, dUrd Fluo, Tg Fluo et Tg Rhod, suivies sur lecteur Stratagène ; volume de lecture 5 μ l

Figure 36

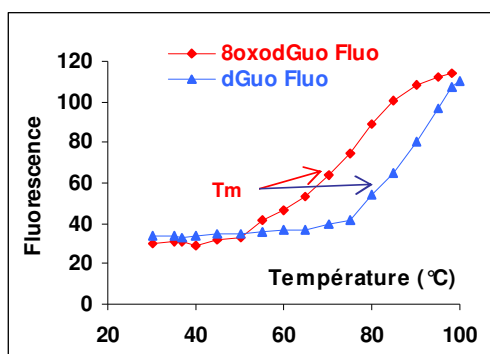


Figure 37

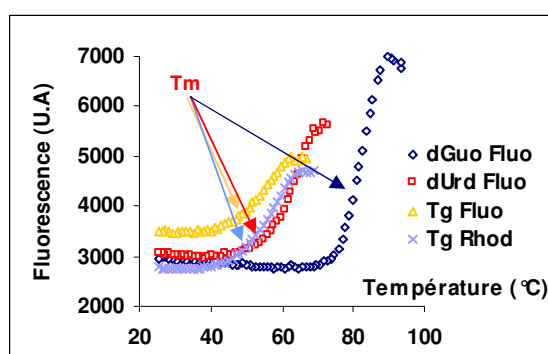


Figure 38 : Tableau récapitulatif des températures de fusion mesurées

"hairpin" 100 nM	T _m (°C) sur LS 50B	T _m (°C) sur Stratagène	+/- (°C)	ΔT _m (°C) (/ dGuo Fluo)	Paire de Bases appariées
dGuo Fluo	85,5	81,5	3,7	-	G : C
8oxodGuo Fluo	78	75,9	1,7	5	8oxoG : C
dUrd Fluo	61	60,7	1,7	20	U : G
dUrd Rhod	66	64,8	2,6	16	U : G
Tg Fluo	51,3	52,7	1,5	30	Tg : A
Tg Rhod	58	55,7	1,7	25	Tg : A

On note que les lésions insérées ont une influence sur la valeur du T_m, généralement corrélée à une baisse de ce dernier. Elles déstabilisent la structure entraînant une diminution de la température de fusion, avec un décalage des points d'inflexion et des courbes vers les basses températures. Chaque "hairpin" se trouve ainsi spécifiquement caractérisée. La présence d'un mismatch peut expliquer le delta important de T_m. La présence d'un mismatch est reconnue pour déstabiliser grandement la stabilité d'une structure double-brin. De même, la forte diminution du T_m pour les sondes contenant le diol de thymine peut refléter la forte cytotoxicité de cette lésion (le glycol de thymine est une lésion bloquant le processus de réplication, donc hautement toxique). On peut également remarquer qu'à 37°C, ces "hairpins" sont bien sous forme « quenchée », auto appariée. Les structures en épingle à cheveu contenant les lésions affichent des taux de fluorescence faibles et l'apparition du point d'inflexion révèle le changement de conformation de la forme auto appariée à la forme linéaire.

Bibliographie

- Agarwal, K.L., Büchi, H., Caruthers, M.H., Gupta, N., Khorana, H.G., Kleppe, K., Kumar, A., Ohtsuka, E., Rajbhandary, U.L., van de Sande, J.M., Sgaramella, V., Weber, H., & Yamada, T. (1970) *Nature*, **227**, 27-34.
- Beaucage, S.L. & Iyer, R.P. (1992) Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Tetrahedron*, **48**, 2223-2311.
- Boiteux, S. & Radicella, J.P. (2000) The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*, **377**, 1-8.
- Caruthers, M.H., Beaucage, S.L., Efcavitch, J.W., Fisher, E.F., Matteucci, M.D., & Stabinsky, Y. (1980) New chemical methods for synthesizing polynucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser*, 215-23.
- Froehler, B.C., Ng, P.G., & Matteucci, M.D. (1986) Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Res*, **14**, 5399-407.
- Gasparutto, D., Cognet, S., Roussel, S., & Cadet, J. (2005) Synthesis of a convenient thymidine glycol phosphoramidite monomer and its site-specific incorporation into DNA fragments. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 1831-42.
- Gilham, P.T. & Khorana, H.G. (1958) *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6212-6222.
- Goodchild, J. (1990) Conjugates of oligonucleotides and modified oligonucleotides: a review of their synthesis and properties. *Bioconjug Chem*, **1**, 165-87.
- Marras, S.A., Kramer, F.R., & Tyagi, S. (2002) Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, **30**, e122.
- Michelson, A.M. & Todd, A.R. (1955) *J. Chem. Soc.*, 2632-2638.

Troisième partie

Validation et étude de l'efficacité des sondes « FRET »

Troisième partie

Validation et étude de l'efficacité des sondes « FRET »

I.	Etude de la dégradation non spécifique des « hairpins » par la Nucléase P1	103
A.	Effet dose réponse de l'enzyme et des substrats	103
B.	Effet du pH sur le signal fluorescent.....	105
1.	Influence du pH sur la détection du signal de la Fluorescéine (FLUO)	105
2.	Influence du pH sur le signal de la Rhodamine (TAMRA).....	107
II.	Etude de la reconnaissance spécifique par des ADN <i>N</i> -glycosylases	108
A.	Action de la protéine Fpg sur la sonde « hairpin » 8-oxodGuo Fluo	108
1.	Caractérisation spectrale du mélange, pré et post-digestion par la Fpg	108
2.	Spécificité de reconnaissance de la lésion par l'enzyme.....	109
3.	Influence de la température sur la digestion par la protéine Fpg de la sonde « hairpin » 8-oxodGuo Fluo.....	110
4.	Quantification de l'activité enzymatique de réparation : Relation dose-réponse	111
5.	Mise en évidence d'inhibition de la réparation de l'ADN.....	113
a	Détection d'une inhibition par compétition : Modèle de la Fpg et de 8-oxo-7,8-dihydroguanine par analyse fluorescente	114
b	Confirmation par analyse EGPA.....	116
B.	Etude de l'activité de OGG1 sur les sondes dGuo Fluo et 8-oxodGuo Fluo	118
1.	Analyse par électrophorèse (EGPA) de l'interaction enzyme substrat	118
2.	Comparaison des méthodes d'analyse par EGPA et par suivi de l'inhibition du quenching de fluorescence.....	120
C.	La sonde Tg Rhodamine : le diol de thymine substrat pour l'Endonucléase III	122
1.	Caractérisation de la sonde par EGPA	122
2.	Etude de la sonde Tg Rhod par fluorescence.....	123
III.	Application du test de fluorescence à l'étude d'une activité glycosylase stricte : la sonde « hairpin » dUrd Fluo et l'UNG (ADN <i>N</i> -glycosylase monofonctionnelle)	124
A.	Analyse par EGPA de l'excision de la lésion uracile.....	124
B.	Analyse par Fluorescence de l'excision de la lésion uracile.....	127
1.	Reconnaissance enzyme substrat.....	127
2.	Mise en évidence par Fluorescence de la séquence d'action des enzymes.....	128
C.	Analyse par Fluorescence de l'inhibition sélective de la réparation de l'uracile par UGi	129

Validation et étude de l'efficacité des sondes « FRET »

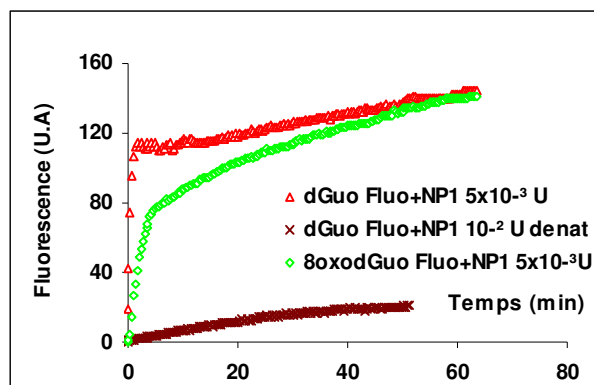
Dans la cellule procaryote ou eucaryote, les enzymes de réparation sont les acteurs privilégiés en charge du maintien de l'intégrité du génome, par éradication des éventuelles altérations présentes sur la séquence d'ADN. Lorsque ces enzymes sont non fonctionnelles et/ou structuralement déficientes, les erreurs s'accumulent et les processus de cancérisation peuvent en résulter. Il est donc essentiel de pouvoir mesurer ces capacités de réparation cellulaire, afin de pouvoir préciser l'existence et le type de déficience enzymatique présente au sein de la cellule. A ces fins, nous avons testé nos sondes dans différentes conditions *in vitro*, le tout suivi par fluorescence ou par EGPA. La démarche expérimentale globale a été la suivante : nous avons traité les sondes par une nucléase, afin de nous assurer de la bonne activité de ces nouveaux substrats, et de façon à obtenir un signal maximum, servant de référence pour les expériences de digestion plus spécifique par des glycosylases. Puis, à partir d'un couple « hairpin » substrat enzyme, nous avons exploré les différents paramètres susceptibles d'influencer le signal fluorescent obtenu, afin de pouvoir optimiser les conditions de détection pour accéder aux constantes cinétiques des enzymes impliquées.

I. Etude de la dégradation non spécifique des « hairpins » par la Nucléase P1

A. Effet dose réponse de l'enzyme et des substrats

Dans un souci de calibration de notre test, nous avons incubé nos différentes sondes « hairpins » en présence de Nucléase P1 (qui hydrolyse les ponts 3' et 5' phosphodiester à pH 5,3 et uniquement les liaisons 3' phosphomonoester des résidus 3' phosphate à pH 7,2). Ceci a pour objectif l'obtention d'une approximation des valeurs fluorescentes maximales correspondant à un 100% de dégradation. Les incubations ont été effectuées avec des concentrations « d'hairpin » comprises entre 50 nM et 500 nM (soit entre 50 ng et 500 ng). Ainsi la figure 39 représente l'action d'un large excès enzymatique sur une variété de sondes hairpins.

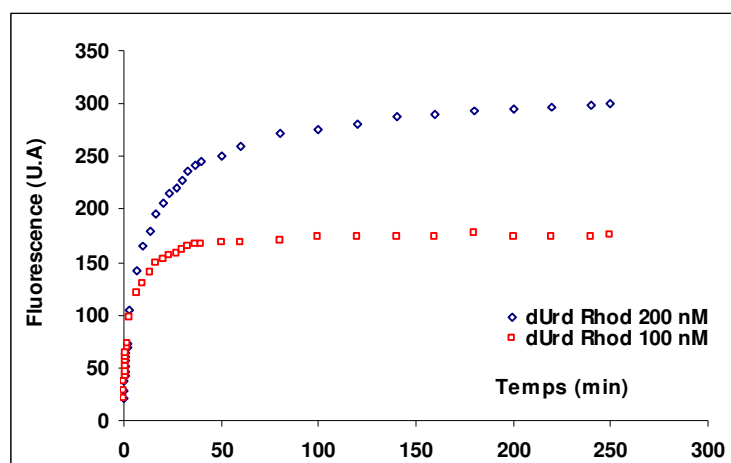
Figure 39: Intensité de fluorescence des substrats marqués par la fluorescéine après traitement par la Nucléase P1 (suivie par Spectrofluorimètre LS 50B ; $\lambda_{ex} = 492 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$)



On note qu'après 30 minutes d'incubation et pour des concentrations de 100 nM en « hairpin », un plateau de fluorescence est atteint (il n'y a plus de variations significatives de fluorescence jusqu'à l'atteinte de l'asymptote de fluorescence) aux alentours de 150 unités de fluorescence (LS 50B, spectrofluorimètre Perkin-Elmer) et ce, quelque que soit l'hairpin. De façon plus schématique, il apparaît que le signal de fluorescence est multiplié d'un facteur compris entre 6 et 8 avec un traitement par la Nucléase P1 en excès. En revanche, si on dénature thermiquement la nucléase P1, on note une diminution de l'activité de cette dernière. En effet, le traitement de « l'hairpin » dGuo Fluo à 100 nM par 10^{-2} unités de cette enzyme dénaturée, donne lieu à une très faible augmentation du signal de fluorescence (courbe « dGuo Fluo + Nucléase P1 10^{-2} U dén. »), en comparaison avec un traitement par $5 \cdot 10^{-3}$ unités de Nucléase P1 (soit une quantité d'enzyme deux fois moindre), mais non dénaturée, sur les autres substrats.

Si on fixe désormais la concentration en Nucléase P1 à 10^{-3} unités et que l'on fait varier la concentration en substrat, la fluorescence maximale varie également. En revanche, la vitesse à laquelle est atteinte l'asymptote respective de chaque profil de fluorescence varie très peu (un temps de 30 à 40 min d'incubation en présence de la nucléase est nécessaire). Il existe, comme le montre la figure 40, un effet dose-réponse entre la quantité d'enzyme mise en solution et la concentration de la sonde. La sonde dUrd Rhod à deux concentrations différentes est incubée en présence de 10^{-3} unités de Nucléase P1 et le signal fluorescent est suivi à $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$, après excitation à $\lambda_{ex} = 560 \text{ nm}$.

Figure 40: effet dose-réponse entre la concentration de sonde "hairpin" dUrd Rhod et la quantité de N P1



Cette figure montre l'augmentation d'intensité du plateau fluorescent pour « l'hairpin » dUrd Rhod 200 nM, par rapport à la même sonde à une concentration de 100 nM, traités dans les mêmes conditions expérimentales et avec la même quantité de Nucléase P1.

B. Effet du pH sur le signal fluorescent

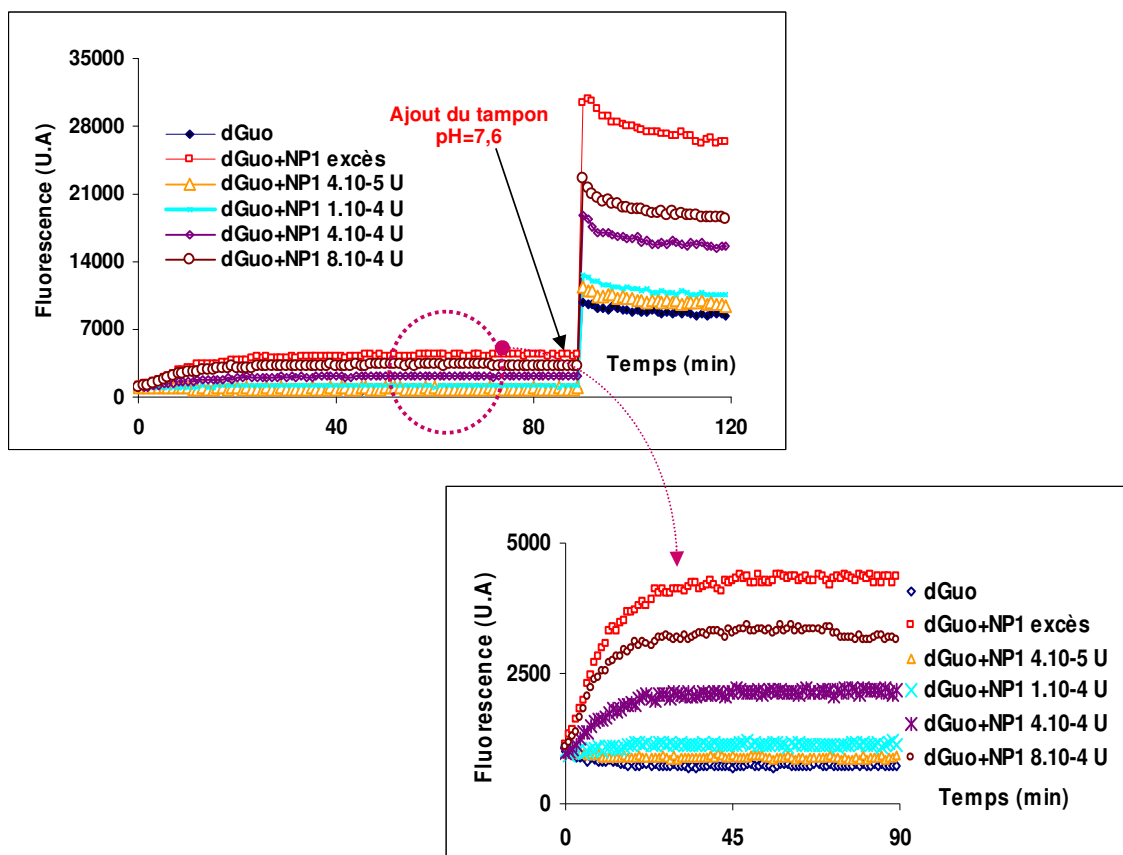
Les sondes utilisées sont marquées soit par le FLUO soit par le TAMRA. La fluorescéine est extrêmement sensible tant au pH qu'à la force ionique du milieu d'analyse ou encore au « photobleaching ». Le pH optimal de fluorescence pour le FLUO avoisine 8. La rhodamine semble beaucoup plus stable que le FLUO et insensible aux paramètres précédemment mentionnés. Dans l'optique d'une calibration optimale sur tous les formats de détection possible (spectrofluorimètre LS 50 B ou lecteur microplaque VICTOR³, Perkin-Elmer), nous avons étudié l'influence du pH sur les deux types de fluorochromes selon deux approches complémentaires.

1. Influence du pH sur la détection du signal de la Fluorescéine (FLUO-dT)

La première approche consiste à traiter « l'hairpin » dGuo (300 nM) par différentes concentrations de Nucléase P1 et à suivre la cinétique de digestion à l'aide du lecteur microplaque VICTOR 3, dans l'eau distillée. En fin de digestion, signalée par l'atteinte d'un

plateau de fluorescence, on rajoute le tampon enzymatique⁹ 1X à pH 7,6. Ce tampon est celui dans lequel toutes les expérimentations seront conduites ultérieurement. On note ensuite des variations de fluorescence induites par l'ajout de ce tampon. La figure 41 montre les variations de l'intensité de fluorescence de « l'hairpin » dGuo marqué par le FLUO-dT au cours de cette expérience.

Figure 41: Influence du pH sur le signal émis par FLUO-dT : Influence du tampon pH 7,6 après digestion de 300nM dGuo par différentes concentrations de NP1 (suivi par VICTOR 3)



Tout d'abord, la première phase de digestion dans le milieu à pH = 5,3 met en évidence l'existence d'une relation entre la fluorescence et la quantité d'enzyme utilisée pour la digestion. On note l'augmentation concomitante du signal de fluorescence du milieu (et de la valeur de

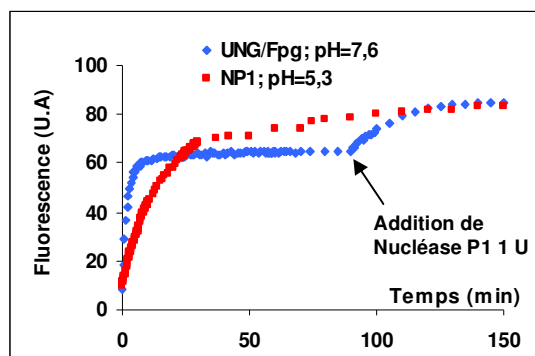
⁹ Les réactions enzymatiques en présence des glycosylases mentionnées (Fpg : 2,6 µg/µl ; Endo III : 2,2 µg/µl ; yOggI : 1,7 µg/µl, UNG : 2 U/µl) sont effectuées dans un tampon 1 X composé de 25 mM Tris-HCl, 2 mM Na₂EDTA et 50 mM NaCl, pH 7,6. Les réactions enzymatiques de digestion par la nucléase P1 (0,2 U/µl) se font également dans ce tampon.

l'asymptote du signal fluorescent) avec celle de la Nucléase P1. On constate ensuite une nette variation de fluorescence après ajustement du pH à 7,6. Les écarts de fluorescence entre le substrat non traité par l'enzyme et les signaux maxima de digestion sont respectés avant et après addition du tampon (facteur d'augmentation de fluorescence ≈ 5). Ceci suggère que seule l'intensité de fluorescence du FLUO-dT a été modifiée et démontre la forte influence du pH sur la détection du signal fluorescent. Pour ces raisons, toutes les expériences à suivre seront effectuées à ce pH et dans ce tampon enzymatique, afin de calibrer le signal fluorescent détecté.

2. Influence du pH sur le signal de la Rhodamine (TAMRA-dT)

La seconde approche utilisée pour étudier l'influence du pH sur la rhodamine, diffère légèrement de la première. En effet, nous basons ici notre réflexion sur la comparaison entre les signaux de fluorescence de digestion d'un « hairpin » dUrd Rhod (60nM) par la Nucléase P1 et ceux issus de la digestion par UNG/Fpg de ce même substrat. La figure 42 présente deux cinétiques de digestion de « l'hairpin » dUrd Rhod, traité à pH 7,6 par le mélange enzymatique UNG/Fpg ou à pH 5,3 lors de l'incubation avec la Nucléase P1.

Figure 42: Influence du pH sur le signal émis par la rhodamine : Digestion dUrd Rhod 60 nM par: UNG/Fpg (1 U+0,6 μ M) pH=7,6 ou NP1 (0,2 U) pH=5,3



La digestion de « l'hairpin » dUrd Rhod par la Nucléase P1 à pH = 5,3 conduit au même plateau de fluorescence que celui obtenu après la digestion spécifique par les glycosylases, à pH 7,6, additionné de Nucléase P1 en fin d'expérimentation pour atteindre une coupure complète. Dans les deux cas, le plateau de fluorescence maximale est atteint, suggérant que : les sondes ont été

entièrement coupées, et que dans les deux cas, les signaux émis en fin de réaction sont identiques, malgré la différence de pH. Ainsi, on confirme l'insensibilité du TAMRA au pH, déjà décrite dans la littérature (cf. site Internet de Invitrogen/ Molecular probes). Ces expériences ont eu comme répercussion la calibration systématique des solutions « d'hairpins » dans le tampon à pH 7,6, valeur compatible avec l'activité enzymatique et une détection fiable et sensible des signaux fluorescents, indépendamment du marqueur utilisé ainsi que du format de détection utilisé.

III. Etude de la reconnaissance spécifique par des ADN *N*-glycosylases

A. Action de la protéine Fpg sur la sonde « hairpin » 8-oxodGuo Fluo

Nous nous sommes intéressés à la réparation spécifique de la lésion 8-oxo-7,8-dihydroguanine par la Fpg. La vérification de la bonne insertion des lésions au cours de la synthèse chimique a confirmé la présence de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine au sein de l'ADN. En effet, l'incubation de l'enzyme avec son substrat donne lieu à la formation d'un fragment plus court que l'hairpin initiale non traitée après marquage et analyse par électrophorèse sur gel (EGPA). Ainsi peut on déjà conclure que les structures « hairpins » sont de bons substrats pour les glycosylases. Nous avons réitéré l'expérience de cinétique de digestion de « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo par la Fpg, suivie cette fois par fluorescence et dans différents formats de détection (les volumes de solutions utilisés sont de 100 µl en analyse fluorescente et 10 µl en EGPA).

1. Caractérisation spectrale du mélange, pré et post-digestion par la Fpg

Un spectre d'excitation et d'émission de l'hairpin 8-oxodGuo Fluo (100 nM) a été enregistré avant et après incubation avec Fpg (165 nM, large excès) à l'aide du spectrofluorimètre LS 50 B, réglé aux longueurs d'ondes d'utilisation du FLUO-dT. Les résultats sont exposés dans les figure 43 et figure 44.

Figure 43 Spectres d'excitation (courbes bleues) et spectres d'émission (courbes rouges) de la sonde 8-oxodGuo Fluo avant ajout de Fpg

Figure 44 : Spectres d'excitation (courbes bleues) et spectres d'émission (courbes rouges) de la sonde 8-oxodGuo Fluo après ajout de Fpg 165 nM

Figure 43

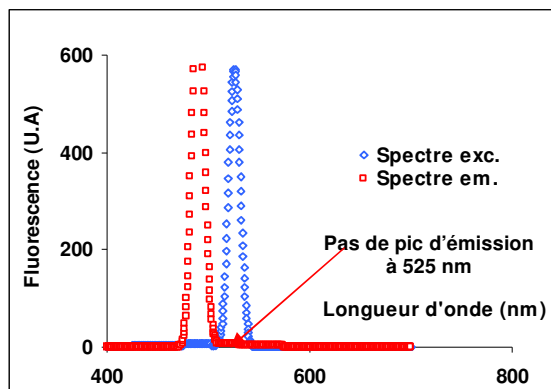
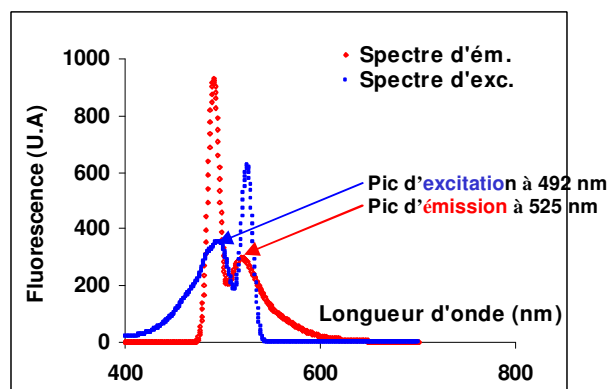


Figure 44

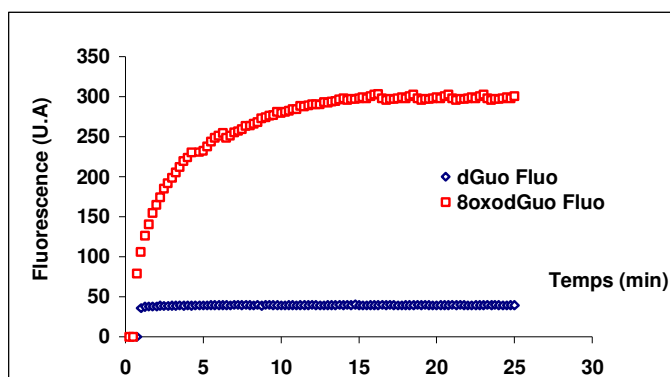


Avant digestion par la Fpg, on ne détecte aucun pic d'émission à 525 nm (Figure 43) confirmant la structure « quenchée » de « l'hairpin » en solution. Après digestion par l'enzyme (Figure 44), l'apparition d'un signal de fluorescence caractéristique du FLUO-dT (pic d'émission à 525 nm) indique que la lésion a été reconnue par l'enzyme, puis incisée et éliminée de la séquence « hairpin ». Ceci conduit à la libération du fragment (29-mère) marqué par le FLUO-dT, libre en solution et non « quenché ».

2. Spécificité de reconnaissance de la lésion par l'enzyme

Consécutivement à l'expérience précédente, nous avons suivi en temps réel la cinétique de digestion et de réparation de « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo traité par Fpg. En parallèle, « l'hairpin » dGuo Fluo non lésé a été incubé avec Fpg dans les mêmes conditions. Les résultats rapportés dans la Figure 45 montrent par fluorescence la spécificité d'action de l'enzyme sur son substrat.

Figure 45: Spécificité de reconnaissance de l'enzyme sur son substrat : Cinétique de digestion des hairpins dGuo Fluo et 8oxodGuo Fluo (200nM) traités par Fpg (165 nM)



En effet, cette figure met en évidence la différence de fluorescence après traitement par la Fpg entre les deux sondes. Ces résultats suggèrent la reconnaissance spécifique de la sonde hairpin « 8-oxodGuo Fluo » par la Fpg, puisque seul son signal varie dans le temps. Cette augmentation de fluorescence se stabilise dans le temps à une valeur maximale, indiquant que tout le substrat a été digéré. En revanche, « l'hairpin » dGuo Fluo traité par la Fpg dans les mêmes conditions ne montre aucune variation de fluorescence, suggérant que « l'hairpin » n'est pas reconnu par l'enzyme. Ainsi peut on postuler que l'excision de lésion au sein de nos sondes hairpins se fait de façon spécifique en fonction de la lésion et de l'enzyme utilisée.

3. Influence de la température sur la digestion par la protéine Fpg de la sonde « hairpin » 8-oxodGuo Fluo

Nous avons étudié l'influence de la température d'incubation de l'enzyme Fpg sur son substrat, « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo. Les résultats de cette étude sont présentés dans les Figure 46 et Figure 47 avec deux formats de détection fluorescente (Figure 46: Spectrofluorimètre LS 50B et Figure 47: lecteur microplaque Victor 3).

Figure 46: Influence de la température sur l'incubation de 8oxodGuo Fluo (200 nM) avec Fpg (165nM) (LS 50B)

Figure 47: Influence de la température sur l'incubation de 8oxodGuo Fluo (200 nM) avec Fpg (165nM) (Victor 3)

Figure 46

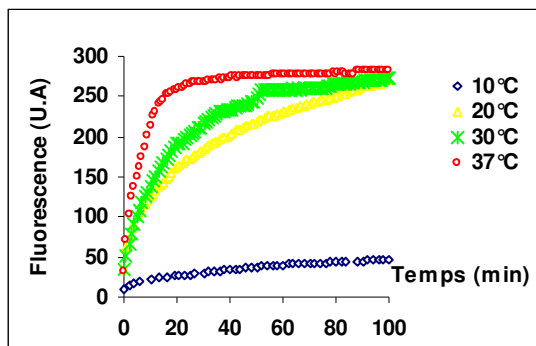
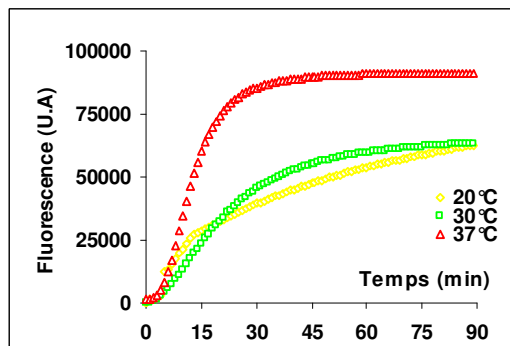


Figure 47



L'analyse de ces courbes de digestion en fonction de la température permettent de conclure sur le point suivant : la détection par fluorescence met en évidence une meilleure activité de réparation enzymatique pour des températures supérieures à 30°C (courbes rouges sur les deux graphes). En effet, le signal de fluorescence de « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo incubé avec Fpg à des températures inférieures à 37°C atteint un plateau inférieur et de façon plus lente qu'à 37°C. La fluorescence maximale est atteinte le plus rapidement et de façon permanente pour une température de 37°C, valeur qui sera retenue pour toutes les expériences suivantes.

4. Quantification de l'activité enzymatique de réparation : Relation dose-réponse

Afin d'étudier la linéarité du signal fluorescent en fonction de la quantité d'enzyme utilisée et de substrat, « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo (deux concentrations : 150 et 300 nM) a été traité par des concentrations croissantes de Fpg, à 37°C et à pH 7,6. La Figure 48 illustre les résultats obtenus par suivi de la cinétique « online » sur le lecteur microplaque Victor 3. On note une augmentation de fluorescence corrélée de façon positive à celle de la concentration d'enzyme. Ces résultats prouvent l'excellente relation dose-réponse du test fluorescent. Les données présentées dans la Figure 49 (même expérience en post marquage et analyse par EGPA) confirment les résultats de fluorescence. On note une augmentation d'activité de coupure spécifique de la lésion avec la concentration d'enzyme. L'aspect quantitatif des résultats et la linéarité de la réponse sont reportés dans la Figure 50.

Figure 48: Cinétique de digestion de 8-oxodGuo Fluo 300 nM par Fpg

Figure 49: Post-marquage et analyse EGPA de la cinétique de digestion de 8-oxodGuo Fluo 100 nM par Fpg

Figure 48

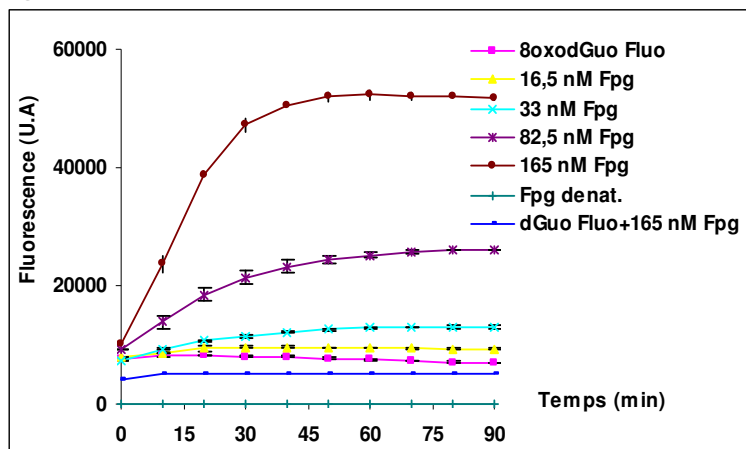


Figure 49

8-oxodGuo Fluo (100 nM) incubé avec Fpg

0 nM 16,5 nM 33 nM 66 nM 165 nM

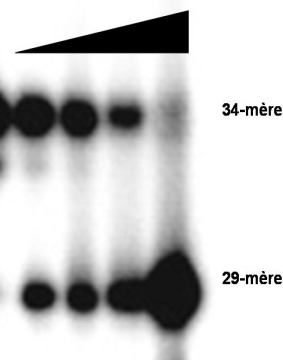
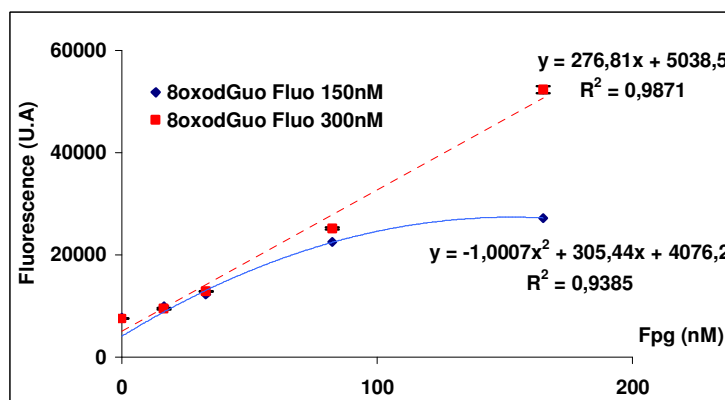
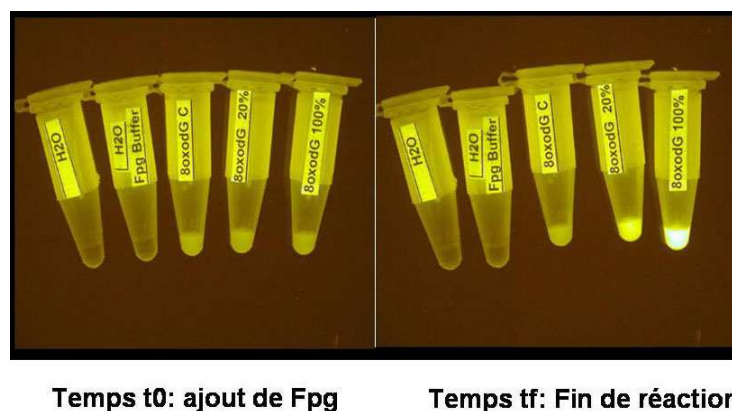


Figure 50: Courbe dose réponse représentant l'augmentation du signal fluorescent en fonction de la concentration en Fpg (digestion de différentes concentrations de sonde « hairpin » 8-oxodGuo Fluo)



Ainsi représentée, la relation liant l'enzyme et son substrat met en exergue la linéarité de la réponse fluorescente à forte concentration de substrat et lorsque l'enzyme est en quantité limitante. Pour des concentrations d'enzymes équivalentes à celles de substrat (courbe bleue : 150 nM en sonde 8-oxodGuo Fluo), la fluorescence atteint un plateau, reflétant certainement la saturation de l'enzyme. Le coefficient de variation lié à ces manipes n'excède pas 1%, soulignant la reproductibilité de détection de la méthode. La Figure 51 donne une illustration du résultat obtenu dans un format en « tube eppendorf ».

Figure 51: Visualisation sous lampe UV de la sonde 8-oxodGuo Fluo incubée en présence de doses croissantes de Fpg pendant 60 min



Pour une quantité donnée de Fpg (correspondant à 100 % d'activité de coupure), on obtient un signal fluorescent quantifiable de manière approximative; on peut estimer *de visu* que la fluorescence du tube correspondant à 20 % d'activité de coupure est 5 fois moins élevée que celle correspondant à 100 % d'activité (5 fois plus de Fpg dans le tube).

Cette détection par spectrofluorimétrie, précise et fiable permettra ultérieurement l'accès aux paramètres cinétiques des enzymes étudiées. Ceci fera l'objet d'un développement dans un chapitre dédié à l'étude enzymologique (chapitre suivant).

5. Mise en évidence d'inhibition de la réparation de l'ADN

Ayant déjà exploré quelques possibilités du champ d'applications de la nouvelle méthode FRET, nous avons voulu déterminer si celle-ci était suffisamment robuste et valide pour l'analyse d'activités d'inhibition de la réparation enzymatique de l'ADN. Les justifications de ce projet sont essentiellement médicales. En effet, certaines molécules sont déjà utilisées en traitement anti-cancéreux, notamment pour inhiber les ADN polymérases et ainsi limiter la prolifération tumorale. Des agents alkylants peuvent être utilisés dans les traitements chimiothérapeutiques contre le cancer dans le but d'induire la mort des cellules tumorales. La cible principale de ces médicaments est la position O⁶ de la base guanine mais plusieurs autres sites peuvent être aussi alkylés. Les agents alkylants thérapeutiques les plus utilisés appartiennent aux classes des moutardes à l'azote, des nitroso-urées et des sels de platine. Les effets de ces drogues sont fortement modulés par les processus de réparation de l'ADN (Drablos *et al.*, 2004). De plus, ces traitements ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses ; ils touchent aussi les cellules normales, d'où la toxicité et les nombreux effets secondaires des chimiothérapies (Drablos *et al.*,

2004). Toutefois, certains patients peuvent parfois s'avérer résistants aux traitements chimiothérapeutiques, (à l'activité génotoxique par induction cellulaire de cassures ou de lésions (méthylations de bases)), par une stimulation intrinsèque trop intense de leurs systèmes enzymatiques de réparations. Ainsi, l'inhibition spécifique de gènes de réparation pourrait être un avantage majeur et un facteur de pronostic favorable pour l'évolution de la réponse cellulaire à ces traitements. Une des applications de nos sondes serait de tester sélectivement certaines activités enzymatiques anormalement élevées chez des patients pour suivre l'inhibition spécifique induite. Il serait également possible de tester ces activités au sein d'une famille connue d'inhibiteurs ou de banques de molécules chimiques pour trouver de nouveaux inhibiteurs.

Nous sommes pour l'instant très en amont de ces projets. Notre but est ici de prouver la capacité de nos sondes à évaluer des perturbations fonctionnelles induites par un inhibiteur donné, sur les glycosylases étudiées vis à vis de leur substrat. La traduction en terme de fluorescence en serait la diminution du signal, reflet d'une baisse d'activité enzymatique.

a Détection d'une inhibition par compétition : Modèle de la Fpg et de 8-oxo-7,8-dihydroguanine par analyse fluorescente

Nous avons basé ici nos expériences sur la capacité de la protéine Fpg à exciser son substrat, la 8-oxo-7,8-dihydroguanine. Une solution « d'hairpin » 8-oxodGuo Fluo à différentes concentrations (50 ou 100 nM) est mise en présence d'une quantité fixe de Fpg (85 nM), mais aussi d'un *duplex linéaire lésé non fluorescent, contenant une 8-oxo-7,8-dihydroguanine*, jouant le rôle de compétiteur pour le site actif de la Fpg. La cinétique est suivie en temps réel et la fluorescence mesurée par le lecteur microplaque Victor 3. Les Figure 52 et Figure 53 montrent respectivement le profil de fluorescence recueilli sur le lecteur microplaque puis, les profils des courbes d'inhibition par le duplex compétiteur de la digestion par Fpg de « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo.

Figure 52 : Effet inhibiteur du duplex 8-oxodGuo/dCyt compétiteur sur la digestion de "l'hairpin" 8-oxodGuo Fluo (100 nM) par la Fpg (85 nM)

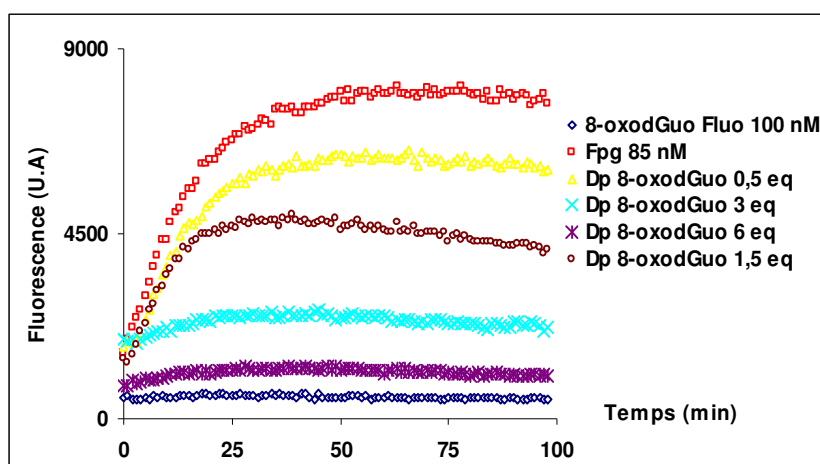
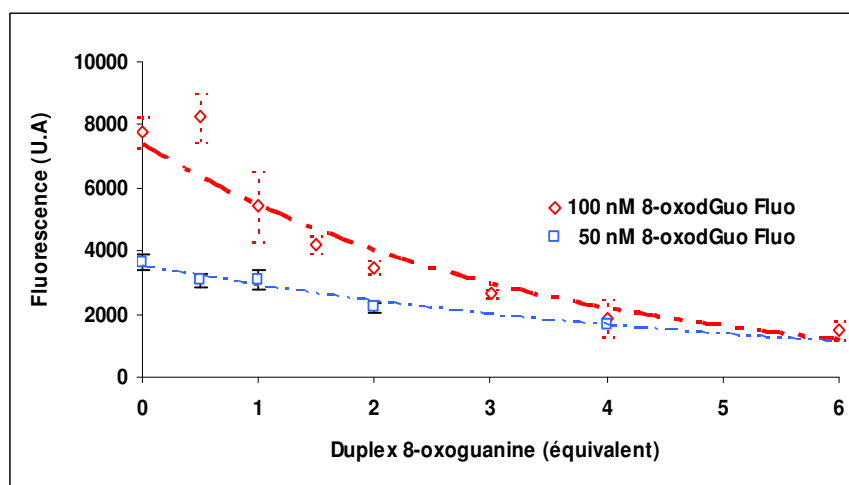


Figure 53: Courbes d'inhibition par le duplex compétiteur 8-oxoguanine de la coupure de « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo lors de la digestion par Fpg (85 nM): Evolution de la fluorescence lors d'une inhibition par compétition



La quantité de duplex inhibiteur utilisée est exprimée dans les deux graphes en «concentration équivalente ». Comme pour la formation du duplex linéaire décrite dans le paragraphe précédent, et indépendamment de la concentration initiale « d'hairpin » ou d'oligonucléotide simple brin, l'inhibition quasi-totale d'activité de Fpg est obtenue pour un ajout de ≈ 4 équivalents d'inhibiteur/compétiteur. Ainsi, la fluorescence diminue progressivement, reflétant la diminution d'affinité de Fpg pour « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo et sa moindre activité réparatrice à son

égard. On note d'ailleurs, que même pour un excès d'inhibiteur, la fluorescence est différente de celle observée à l'état basal. Ceci indique dans ce cas que la Fpg processe une petite quantité « d'hairpin », malgré l'excès de duplex non fluorescent. Notre approche de détection par fluorescence est donc validée.

b Confirmation par analyse EGPA

Pour confirmer ces résultats, un post-marquage au [32 P] a été effectué pour s'assurer de l'excision spécifique de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine et de l'effet dose-réponse parallèlement relevé. La Figure 54 montre le gel correspondant alors que la quantification du signal correspondant est rapportée dans la Figure 55.

Figure 54: Analyse EGPA (15 % dénaturant, 7 M urée) après post marquage de l'inhibition par le duplex compétiteur «froid»

Vérification de l'effet dose réponse d'inhibition par le duplex 8oxodGuo non fluorescent

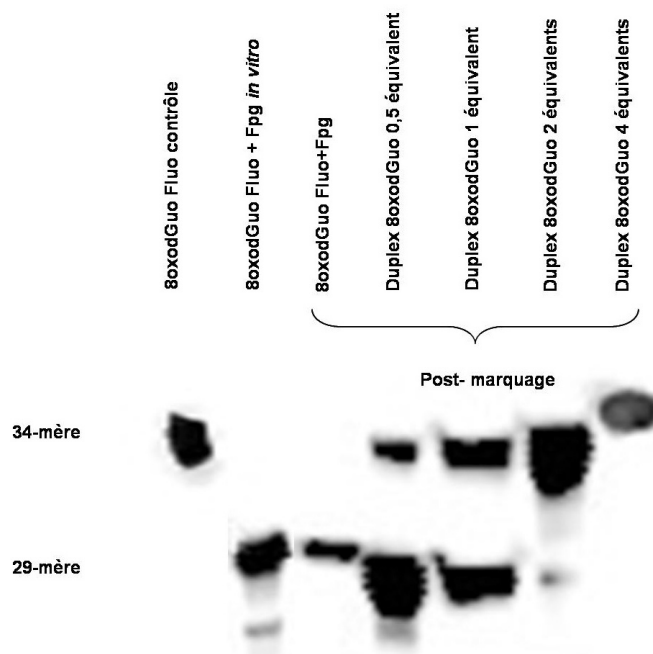
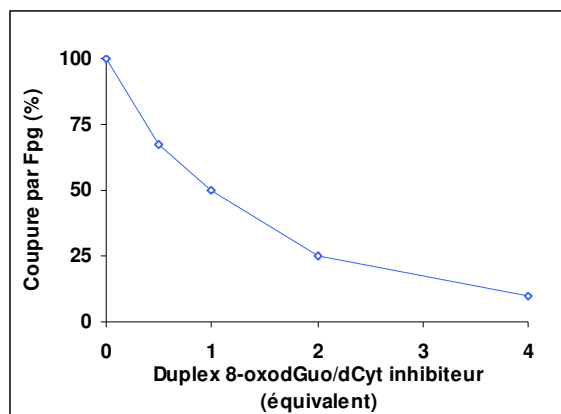


Figure 55: Quantification par EGPA de la coupure par Fpg de "l'hairpin" 8-oxodGuo Fluo en présence de doses croissantes de duplex compétiteur



Sur le gel, le premier dépôt correspond à « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo contrôle, non traité. Le second puit concerne le même « hairpin » traité par un excès de Fpg, *in vitro* afin d'obtenir le témoin de coupure. Les 5 dépôts suivants correspondent aux différents mélanges incubés : l'enzyme, son substrat et son inhibiteur à des concentrations croissantes, issus des post-marquages des fragments contenus dans les solutions fluorescentes. On constate que l'intensité de la bande représentant le produit de coupure diminue avec l'augmentation de la dose d'inhibiteur, ce qui confirme a posteriori les conclusions de l'analyse de fluorescence : plus on augmente la dose d'oligonucléotide inhibiteur, moins l'enzyme a d'affinité pour son substrat « hairpin ». L'affinité de Fpg pour sa lésion 8-oxo-7,8-dihydroguanine ne change pas ; toutefois seul le signal correspondant à « l'hairpin » marqué radioactivement est visible. Ce signal perd de son intensité lorsque la dose de compétiteur augmente, indiquant que la Fpg clive en priorité le double-brin « froid » (non marqué au [^{32}P]) par rapport à « l'hairpin ». Ici encore, la migration des échantillons marqués confirme la bonne interaction de l'enzyme sur son substrat et la coupure des sondes au niveau de la lésion. Les résultats sur la quantification du pourcentage de coupure après migration sur gel sont présentés dans la Figure 55. La forme de la courbe est voisine de celle décrite dans la Figure 53 (profil d'inhibition par compétition suivie en fluorescence dans les mêmes conditions) confirmant à la fois l'approche quantitative de notre méthode ainsi que sa spécificité de détection. On confirme ainsi que le signal fluorescent est du à la génération du produit de clivage spécifique de la lésion insérée. La fluorescence résiduelle observée par le lecteur microplaque correspond à une activité de coupure de la Fpg (environ 10 %) sur « l'hairpin » 8-oxodGuo Fluo, même en présence d'une forte quantité d'inhibiteur compétiteur. Cet effet dose réponse met en avant la spécificité à la fois de détection et aussi d'inhibition. Notre méthode de suivi par test fluorescent s'avère donc capable de détecter de

telles activités sur des systèmes enzymatiques simples (à une enzyme correspond une lésion). L'étape suivante consistera à définir la robustesse de notre méthode sur un système enzymatique plus complexe, faisant intervenir un acteur enzymatique supplémentaire.

B. Etude de l'activité de OGG1 sur les sondes dGuo Fluo et 8-oxodGuo Fluo

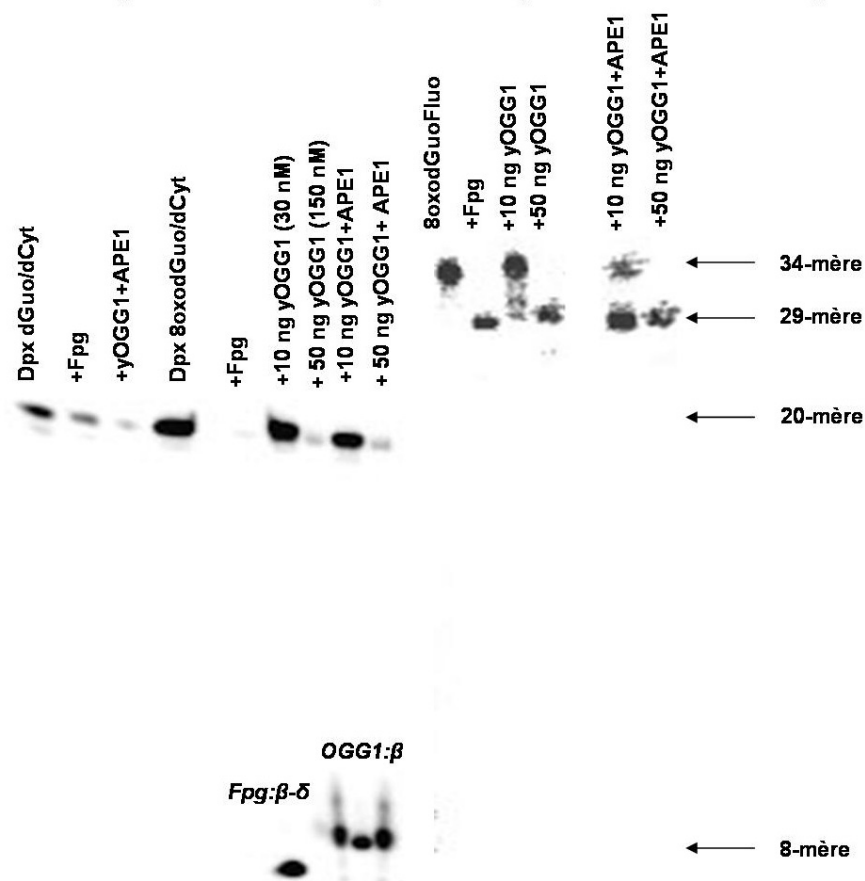
Les résultats de l'étude de digestion de la sonde 8-oxodGuo Fluo par la protéine Fpg nous ont amené à étendre notre étude à une autre enzyme, affine pour la 8-oxo-7,8-dihydroguanine à savoir : OGG1. En effet, chez les mammifères, la 8-oxo-7,8-dihydroguanine est principalement excisée par cette enzyme (homologue fonctionnel de la Fpg bactérienne). Ainsi, si l'OGG1 reconnaît l'hairpin 8-oxodGuo Fluo, nous pourrions envisager l'extension de ce test à des applications diagnostiques chez les Mammifères.

1. Analyse par électrophorèse (EGPA) de l'interaction enzyme substrat

Afin d'étudier la spécificité de reconnaissance et d'excision d'OGG1 sur nos sondes, nous avons traité ces dernières (100 nM) avec deux concentrations d'enzyme. OGG1 est connue pour avoir une si forte affinité pour le site abasique qu'elle génère lors de l'excision de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine que, *in vivo*, une endonucléase (l'AP Endonucléase 1 nucléaire) doit déplacer OGG1 pour permettre de compléter le processus d'excision. Nous avons tenté de reproduire ces conditions dans le tube à essai, afin d'optimiser les conditions de digestion sur nos sondes. En parallèle, la même expérience est effectuée sur les duplex contrôles dGuo/dCyt et 8-oxodGuo/dCyt (20-mère lésés en position 8 à partir de l'extrémité 5') afin de nous assurer de l'absence d'influence de la boucle de l'hairpin sur l'interaction enzyme substrat. Les résultats obtenus par analyse EGPA sont rapportés dans la Figure 56.

Figure 56: Action de OGG1 sur les sondes duplex et "hairpins" : incubation des sondes duplex et « hairpins » avec OGG1 (45 min) puis ajout de APE1 (30 min) à 37°C

Action d'yOGG1 et APE1 sur duplex et « hairpin » contenant une 8-oxoguanine



On peut tirer plusieurs conclusions de l'examen des résultats présentés dans cette figure:

On constate que le duplex 20-mère contrôle ne subit aucune coupure sélective par les enzymes utilisées (pas de migration d'un fragment plus court). Par contre le duplex 8-oxodGuo/dCyt est reconnu par la Fpg. Celle-ci génère après coupure un fragment correspondant au 8-mère. Ce même duplex traité par yOGG1 génère également un 8-mère ayant une plus faible migration électrophorétique par rapport à celui engendré par Fpg. Ceci confirme la différence de mécanisme entre la Fpg (β - δ élimination) et la yOGG1 (β élimination) existantes et décrites dans la littérature (Boiteux *et al.*, 1987; Radicella *et al.*, 1997). On note également un effet coopératif de la part d'APE1 sur yOGG1, puisque 10 ng (environ 30 nM) de cette dernière induisent une faible coupure sur le duplex lésé, alors que l'ajout d'APE1 à ces 10 ng d'yOGG1 semble favoriser la coupure (et l'apparition du 8-mère). De plus, l'efficacité de coupure semble

dépendre de la quantité d'enzyme incubée puisque 50 ng de yOGG1 (150 nM) favorisent une coupure quasi-totale du substrat.

Concernant l'hairpin 8-oxodGuo Fluo : les conclusions sont identiques. Ainsi, la structure hairpin n'affecte pas l'activité des enzymes sur leur substrat, tant pour Fpg que pour yOGG1. De plus, on note ici encore l'effet coopératif d'APE1. En effet, comme précédemment, 10 ng (30 nM) d'yOGG1 induisent peu de clivage, alors que l'ajout d'APE1 donne lieu à une coupure quantitative. De plus, l'efficacité de la réaction de clivage de « l'hairpin » dépend de la quantité d'yOGG1. En effet, des doses d'enzyme > 10 ng génèrent le 29-mère correspondant au site d'excision de la 8-oxo-7,8-dihydroganine. Ainsi, l'enzyme OGG1 est capable de reconnaître la 8-oxo-7,8-dihydroganine insérée dans « l'hairpin » et de l'exciser.

2. Comparaison des méthodes d'analyse par EGPA et par suivi de l'inhibition du quenching de fluorescence

La quantification des résultats obtenus par EGPA concernant l'hairpin a permis de mettre en évidence un effet de saturation de l'activité de l'enzyme pour des quantités d'enzyme supérieures à 50 ng (150 nM) et en absence d'AP Endo. En effet, la coupure par 50 ng d'yOGG1 induit une activité de coupure évaluée à 55 % mais 100 ng d'yOGG1 (300 nM) n'induisent pas d'augmentation supplémentaire. L'expérience a également été effectuée par détection de fluorescence. On observe dans la Figure 57 un plateau de fluorescence atteint pour des concentrations d'enzymes supérieures à 70 nM, en accord avec les résultats précédents issus de l'analyse par EGPA. La Figure 58 illustre la comparaison des deux méthodes, après quantification des signaux issus de l'analyse par électrophorèse (cf. Figure 56) et analyse des signaux obtenus par détection fluorescente (rapportés dans la Figure 57).

Figure 57: Analyse par lecture de fluorescente sur lecteur microplaque Victor 3, de l'effet dose-réponse induit par la protéine yOGG1

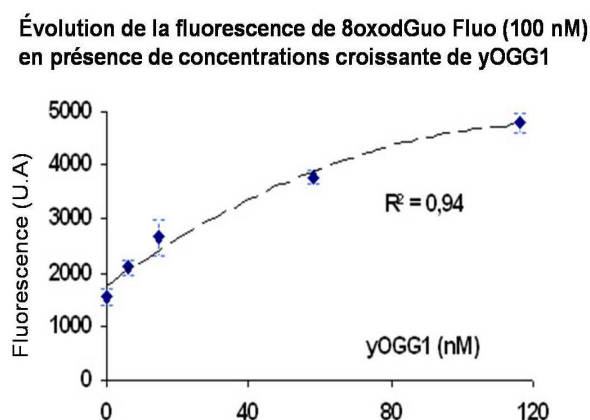
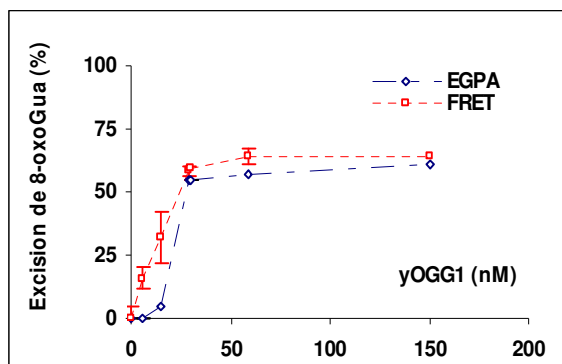


Figure 58: Comparaison du pourcentage d'excision par la protéine yOGG1 de la lésion 8-oxo-7,8-dihydroguanine, détectée par les méthodes FRET (diminution du quenching de fluorescence) et EGPA (analyse par électrophorèse) (100% d'excision correspond à l'excision de 100 nM de 8-oxoGua par la protéine Fpg 165 nM, incubée 60 min à 37°C)



Ces résultats montrent que l'augmentation du signal de fluorescence n'atteint pas son facteur maximal comparativement à celle observée lors d'un traitement par la Fpg (cf. Figure 48). Notons également la concordance des résultats entre les deux méthodes de détection (EGPA et FRET) (Figure 58). La Figure 58 met en évidence l'absence d'activité de coupure supplémentaire par ajout de yOGG1 à partir de 100 nM (environ l'équivalent de 30 ng d'enzyme). Le « turn-over » de l'enzyme est si lent que même un excès d'enzyme ne permet plus d'augmenter le taux d'excision de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, donnée confirmée par la littérature (Hill *et al.*, 2001). La mise en évidence par fluorescence du phénomène de « turn over » lent de la protéine OGG1 permet de conclure sur la validation de la méthode de détection

et quantification par fluorescence. Ceci permet une validation de la méthode de détection pour l'étude de l'activité des ADN-*N*-glycosylases impliquées dans la réparation de l'ADN.

La bonne reconnaissance de « l'hairpin » par l'yOGG1, devrait permettre une large gamme d'applications de cette méthodes (changement de lésion potentiellement reconnue par l'enzyme ; screening d'activités de réparation). On note aussi que ce système d'analyse est souple et robuste en terme de détection. Ceci permettra des mesures dans des systèmes plus complexes afin d'intégrer des variables additionnelles (ici, une enzyme supplémentaire pour augmenter le turn-over de l'enzyme).

C. La sonde Tg Rhodamine : le diol de thymine substrat pour l'Endonucléase III

1. Caractérisation de la sonde par EGPA

Comme effectué précédemment pour toutes nos sondes nucléiques, cette "hairpin" a également subi un contrôle qualité poussé (voir synthèse et caractérisation des oligonucléotides) attestant de la bonne insertion de la lésion dans la structure de l'"hairpin". Nous avons ensuite étudié le comportement de la glycosylase, à savoir l'endonucléase III vis-à-vis de sa sonde préférentielle. La Figure 59 représente un gel électrophorétique, illustrant la relation dose réponse entre l'enzyme et son substrat. L'"hairpin" Tg Rhod est successivement incubé avec des concentrations croissantes d'enzymes. Les résultats concernant l'activité de clivage de la lésion par l'enzyme sont présentés dans la Figure 60.

Figure 59: Analyse EGPA de « l'hairpin » Tg Rhod incubée en présence d'Endo III

Figure 60: Pourcentage d'incision de la sonde Tg Rhod en fonction de la quantité d'Endo III

Figure 59

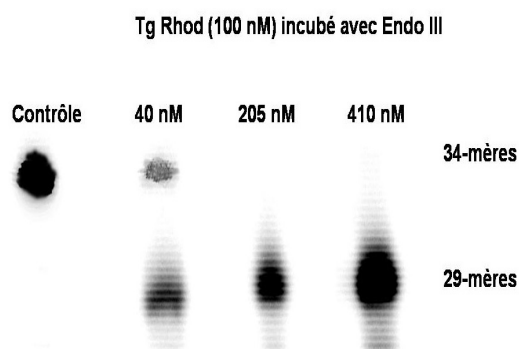
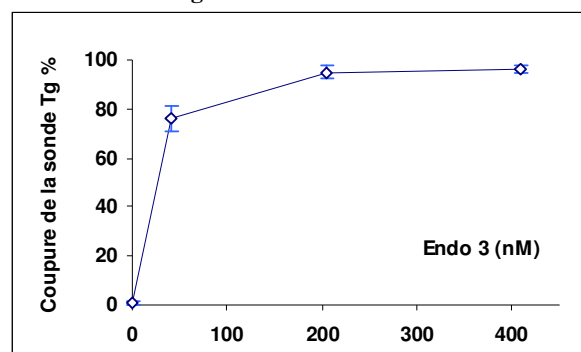


Figure 60



On constate que pour de faibles concentrations en enzyme, la majorité du substrat est clivée, confirmant ainsi la bonne reconnaissance et l'efficacité de l'endonucléase III pour son substrat.

2. Etude de la sonde Tg Rhod par fluorescence

La sonde Tg Rhod (100 nM) a été incubée en présence de 0,05 U de Nucléase P1 (excès) ou d'Endonucléase III (410 nM, excès), à pH 7,6 et à une température de 37°C. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées par le spectrofluorimètre LS50 B. Les résultats sont rapportés dans la Figure 61. La Figure 62 illustre ces mêmes résultats sous un format différent.

Figure 61: Variations de fluorescence induites par la Nucléase P1 (0,05 Unité, courbe rouge) ou Endo III (410 nM ; courbe bleue) sur la sonde Tg Rhod (100 nM)

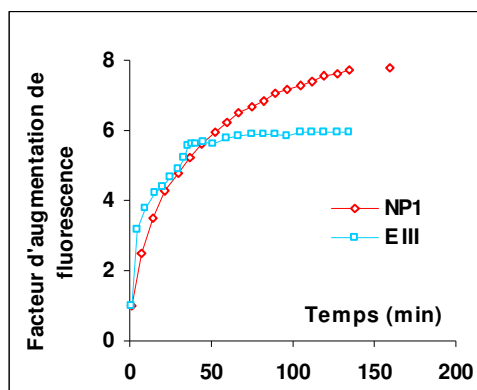
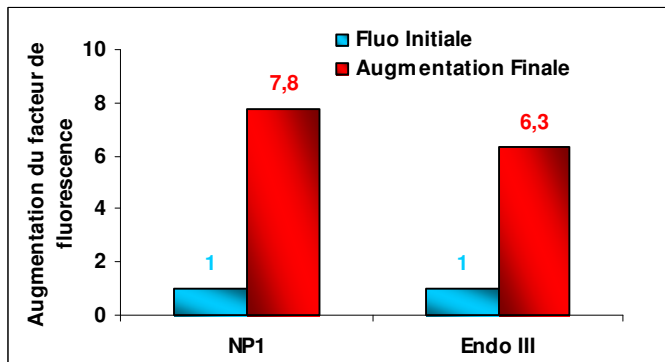


Figure 62: Facteur d'augmentation de fluorescence de la sonde Tg Rhod (100 nM) en présence de différentes enzymes (Nucléase P1 : 0,05 Unité et Endo III : 410 nM)



Les résultats présentés dans ces deux figures confirment à la fois le facteur d'augmentation de fluorescence ≈ 8 déjà trouvé dans les études précédentes sur nos sondes traitées par la nucléase P1 et atteste de la dégradation totale de ladite sonde. En comparaison, le facteur d'augmentation de fluorescence établi pour la digestion par l'Endo III (cette augmentation plafonne aux alentours d'une valeur de 6) semble correspondre au maximum de substrat clivé par l'enzyme de façon catalytique avant que celle-ci ne s'épuise. Ces caractéristiques fluorescentes ainsi établies nous ont permis d'effectuer des comparaisons et des quantifications lors de l'étude de mélanges de sondes lésées.

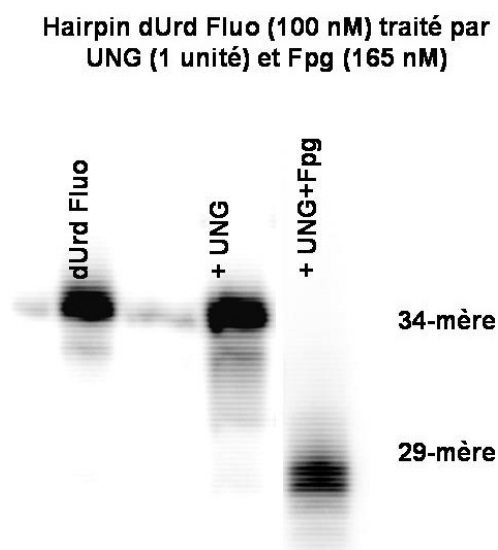
IV. Application du test de fluorescence à l'étude d'une activité glycosylase stricte : la sonde « hairpin » dUrd Fluo et l'UNG (ADN N-glycosylase monofonctionnelle)

A. Analyse par EGPA de l'excision de la lésion uracile

Processer une lésion de type uracile au sein de l'ADN nécessite de la part des enzymes impliquées dans cette réparation de posséder une activité glycosylase, afin de créer un site abasique ainsi qu'une activité lyase afin de générer la coupure du maillon pentose phosphate (elle même prise en charge par la cascade enzymatique suivant l'excision de la lésion) après l'élimination de la base modifiée.

« L'hairpin » dUrd nous sert de modèle pour illustrer *in vitro* le mécanisme en deux étapes réalisé *in vivo* par les systèmes de réparation. La Figure 63 représente l'analyse par EGPA de « l'hairpin » dUrd Fluo traité soit par l'UNG seule (création du site abasique), soit par l'association de l'UNG et de la Fpg pour l'apport de l'activité lyase (*in vivo*, c'est souvent l'AP Endonucléase 1 qui agit).

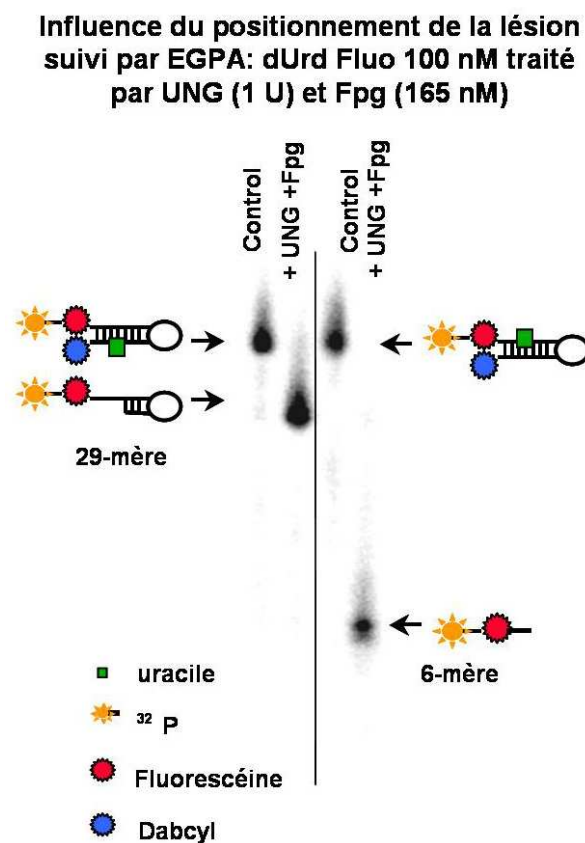
Figure 63: Analyse de la sonde dUrd Fluo incubée avec UNG/Fpg par EGPA



L'analyse révèle l'incapacité de l'UNG seule à induire la coupure de « l'hairpin ». En effet, le fragment plus court, en l'occurrence le 29-mère généré après coupure au niveau du site uracile, n'apparaît qu'après incubation combinée avec la Fpg. La présence de la Fpg et de son activité lyase est donc nécessaire au clivage du fragment d'ADN contenant la lésion uracile.

Nous avons également étudié l'influence du positionnement de la lésion uracile sur les brins complémentaires de « l'hairpin » dUrd Fluo. Pour se faire, un second substrat dUrd Fluo a été synthétisé avec la lésion uracile placée en position 6 par rapport au dabcyI en 3'. Les deux substrats ont été mis en présence d'un excès d'UNG et de Fpg afin d'obtenir un clivage maximal de la lésion dans chacun des deux cas. La Figure 64 montre le résultat d'un gel électrophorétique obtenu au cours de cette expérience.

Figure 64: Suivi par EGPA de l'influence du positionnement de la lésion uracile dans l'hairpin



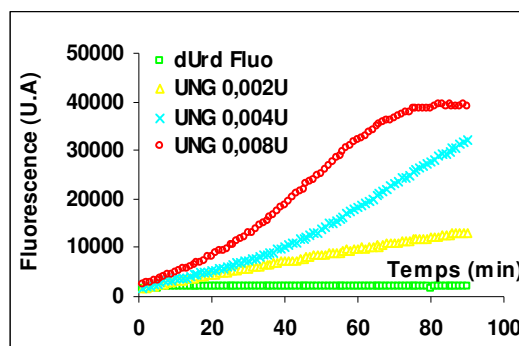
Cette analyse met en évidence deux produits de coupure, issus de la reconnaissance spécifique de l'uracile et du clivage du fragment d'ADN au niveau du site abasique par le mélange UNG/Fpg. Ces deux produits migrent de façon différente puisqu'ils n'ont pas le même poids moléculaire. Ainsi, la lésion, qu'elle soit insérée en 5' ou en 3', est reconnue par l'UNG alors que la Fpg coupe « l'hairpin » dans l'étape suivante. Le positionnement de l'uracile par rapport aux extrémités 3' et 5' n'a pas d'influence significative sur la bonne reconnaissance et l'addition de l'enzyme sur son substrat.

B. Analyse par Fluorescence de l'excision de la lésion uracile

1. Reconnaissance enzyme substrat

L'interaction de la sonde « hairpin » dUrd Fluo avec le couple UNG/Fpg a ensuite été étudiée par une approche faisant appel aux propriétés fluorescentes du substrat. Ainsi une première expérience illustrée dans la Figure 65 montre la relation dose-réponse existante entre les concentrations du substrat et les signaux de fluorescence détectés.

Figure 65: Cinétique de réparation de la sonde dUrd Fluo (400nM) par une gamme d' UNG en présence de Fpg (fixe 40 nM)



En effet, l'incubation d'une quantité donnée de dUrd Fluo (400 nM) en présence de concentrations croissantes d'UNG conduit à l'apparition de signaux fluorescents d'intensité croissante, jusqu'à l'atteinte d'un plateau de fluorescence pour lequel tous les sites uraciles sont clivés. Dans cette expérience, suivie en utilisant le lecteur microplaque Victor 3, la concentration de Fpg reste fixe.

Cette expérience met en exergue l'excellente activité de l'UNG sur la sonde dUrd Fluo, déjà observée par analyse électrophorétique et ici détectée par fluorescence. On note aussi l'existence d'une relation dose réponse entre l'enzyme et son substrat, comme précédemment observée pour le couple Fpg/8-oxodGuo Fluo. Cette approche permet donc l'étude de systèmes enzymatiques de réparation un peu plus complexes dans la mesure où ils mettent en jeu deux activités biologiques distinctes (glycosylases et AP-lyase portées par deux enzymes distinctes).

2. Mise en évidence par Fluorescence de la séquence d'action des enzymes

Comme indiqué précédemment, l'UNG ne possède qu'une activité *N*-glycosylase. L'activité lyase manquante est fournie dans nos expériences par l'ajout de Fpg ou encore de l'endonucléase IV, connue sous le nom de NFO. L'utilisation d'une méthode basée sur la fluorescence en temps réel doit permettre l'analyse de ces deux activités enzymatiques de façon spécifique et distincte. Nous avons donc cherché à savoir quelle enzyme agissait en premier sur la lésion contenue dans « l'hairpin ». Durant la thèse, deux types d'expériences ont été effectués :

- Incubation de la sonde dUrd Fluo en présence de doses croissantes d'UNG, suivie de l'ajout d'une quantité fixe de Fpg;
- Incubation de la sonde dUrd Fluo avec des quantités croissantes de NFO, suivie d'un ajout d'UNG en quantité fixe et en excès.

Les variations de fluorescence sont analysées à l'aide du lecteur microplaque ou du spectrofluorimètre. Les résultats sont rapportés dans les Figure 66 et Figure 67.

Figure 66: Détection multi étapes: Digestion de l'hairpin dUrd Fluo (150 nM) par une gamme d'UNG en présence de Fpg (fixe 40 nM) (suivi VICTOR 3)

Figure 67: Ordre d'action des enzymes de réparation de dUrd Fluo (UNG (excès) et NFO (gamme de concentration) ; suivi par LS-50B)

Figure 66

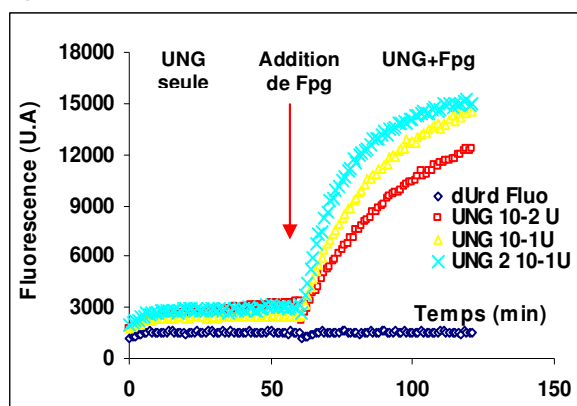
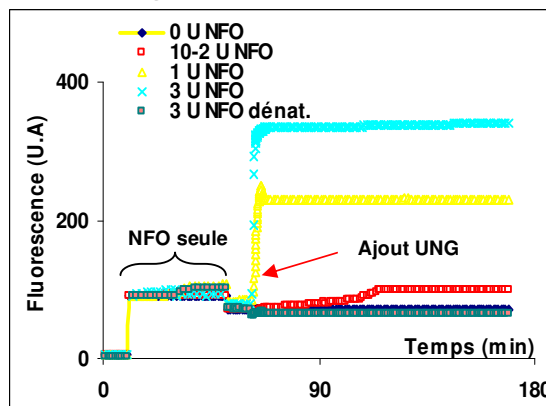


Figure 67



Sur les deux graphes, la première partie des courbes observées confirme le manque d'activité AP lyase de l'enzyme UNG (Figure 66) et l'impossibilité pour la lyase NFO seule d'exciser l'uracile (Figure 67) (pas de variation de fluorescence). L'ajout de Fpg (Figure 66) ou d'UNG (Figure 67) met en évidence une nette augmentation de la fluorescence (ceci est le résultat de l'activité

glycosylase de l'UNG). Il en résulte une augmentation du signal de fluorescence. Ainsi, même en présence d'un excès de lyase, l'UNG doit impérativement générer les sites abasiques en premier. La figure 67 démontre que même un excès d'UNG ne suffit pas à initier l'activité de réparation. Il est nécessaire d'associer une AP endonucléase afin d'obtenir un mécanisme concerté. De plus, la réponse induite par les AP-lyases ou endonucléases (Fpg ou Endo IV/NFO) est dépendante de la quantité d'enzyme confirmant à posteriori l'hypothèse de travail de départ : le signal de fluorescence peut être utilisé pour l'analyse et la quantification d'activité de réparation de l'ADN mettant en jeu des procédés enzymatique « multi étapes ».

C. Analyse par Fluorescence de l'inhibition sélective de la réparation de l'uracile par UGi

L'UNG possède un inhibiteur associé : l'inhibiteur de l'UNG ou UGi (Acharya *et al.*, 2002). Cet inhibiteur forme un complexe avec l'UNG à proximité du site actif de l'UNG et empêche cette dernière de créer les sites abasiques au niveau des résidus uracile contenus dans l'ADN. Nous avons voulu vérifier cette activité inhibitrice sur notre modèle par fluorescence, en utilisant « l'hairpin » dUrd Fluo en présence d'UNG, de Fpg et de quantités croissantes d'UGi. L'effet de l'inhibition d'UGi sur la réparation de dUrd Fluo par action combinée de UNG et Fpg est présenté dans la Figure 68. Les résultats de l'analyse par post marquage effectuée sur les mélanges réactionnels après suivi par fluorescence sont rapportés dans la Figure 69.

Figure 68 : Courbes d'inhibition par UGi sur la réparation de dUrd Fluo par UNG (0,1 unité) /Fpg (85 nM)

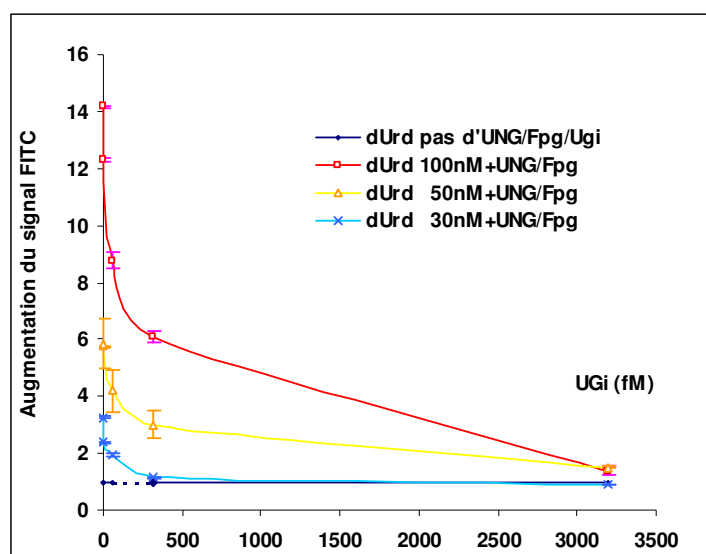
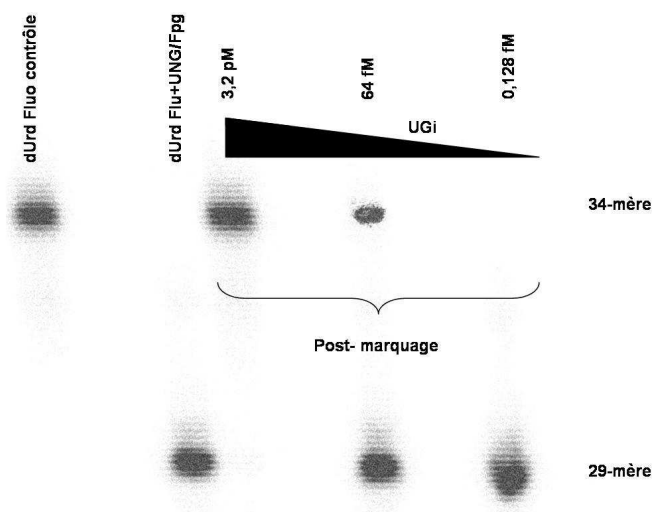


Figure 69: Analyse par électrophorèse sur gel après post-marquage des mélanges réactionnels (EGPA)

Vérification de l'effet dose réponse d'inhibition par UGi sur la réparation de l'hairpin dUrd Fluo traité par UNG/Fpg



Ainsi que le montre la première figure (Figure 68), une diminution notable du signal de fluorescence apparaît consécutivement à l'addition d'UGi dans le milieu et ceci pour de très faibles concentrations, démontrant l'efficacité de l'inhibiteur, et aussi l'aptitude de notre méthode à suivre ces phénomènes dans des systèmes enzymatiques complexes. Le phénomène d'extinction de fluorescence apparaît dose d'inhibiteur dépendant, quelque soit la concentration initiale de sonde dUrd Fluo incubée. Les expériences de post marquage (Figure 69) confirment a posteriori la sélectivité de l'inhibiteur pour l'UNG puisque l'on remarque un effet d'inhibition de réparation qui dépend de la quantité d'inhibiteur. Plus la concentration d'inhibiteur diminue, plus la tâche radioactive correspondant au produit de coupure spécifique de l'uracile devient intense.

Cette étude préliminaire a permis la validation du test de suivi de l'inhibition de « quenching » de fluorescence ainsi que l'optimisation de la méthode comme outil de détection et de quantification des activités de réparation enzymatique des dommages de l'ADN pris en charge par le BER. Dans le cas présent, notre méthode faisant appel à des « hairpins » fluorescentes s'avère être un outil de choix pour mettre en évidence des mécanismes d'inhibition appliqués aux enzymes de réparation, que l'on parle d'inhibition compétitive ou spécifique.

Diverses applications de ce test en terme d'études de spécificité d'interactions ou de screening d'activités sont désormais envisageables. De nombreuses applications de nos sondes en tant

qu'outil de « screening » (d'inhibiteurs) à haut débit pourraient être envisagées. De plus, les paramètres cinétiques des enzymes deviennent accessibles et calculables et font l'objet du chapitre suivant.

Bibliographie

- Acharya, N., Roy, S., & Varshney, U. (2002) Mutational analysis of the uracil DNA glycosylase inhibitor protein and its interaction with Escherichia coli uracil DNA glycosylase. *J Mol Biol*, **321**, 579-90.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., & Laval, J. (1987) Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein. *Embo J*, **6**, 3177-83.
- Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbo, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., & Krokan, H.E. (2004) Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1389-407.
- Hill, J.W., Hazra, T.K., Izumi, T., & Mitra, S. (2001) Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res*, **29**, 430-8.
- Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S., & Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8010-5.

Quatrième partie

Mesure de plusieurs activités enzymatiques de réparation à l'aide des sondes fluorescentes à partir d'enzymes purifiées ou d'extraits cellulaires

Quatrième partie

Mesure de plusieurs activités enzymatiques de réparation à l'aide des sondes fluorescentes à partir d'enzymes purifiées ou d'extraits cellulaires

I.	Etude des cinétiques de réparation en deux couleurs : Réparation des sondes Tg Rhod et 8-oxodGuo Fluo par des enzymes purifiées	137
A.	Action de la Nucléase P1	137
B.	Action des glycosylases spécifiques des lésions sélectionnées.....	138
1.	Spécificité de détection : Incubation avec l'Endonucléase III	138
2.	Action d'une glycosylase moins spécifique : la protéine Fpg	139
3.	Confirmation de la spécificité des enzymes vis-à-vis des sondes lésées par post marquage radioactif et analyse EGPA	140
C.	Accès aux paramètres cinétiques enzymatiques grâce à l'analyse par fluorescence	142
1.	Détermination des paramètres cinétiques de la Fpg.....	143
2.	Paramètres cinétiques de Fpg et d'Endonucléase III	144
II.	Etude de l'activité de réparation des lésions présentes au sein d'extraits cellulaires : exemples de l'uracile ou de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine	149
A.	Analyse d'extraits cellulaires bactériens d' <i>Escherichia coli</i>	149
1.	Analyse de l'activité de réparation de l'uracile par Fluorescence.....	149
2.	Confirmation de l'activité de réparation de l'uracile par analyse EGPA	151
B.	Extraits nucléaires de cellules de Mammifères : Extraits de cellules HeLa et de lignée cellulaire CHO XRS ₅	153
1.	Excision de l'uracile et de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine par des extraits commerciaux de cellules HeLa mise en évidence par Fluorescence	153
2.	Confirmation par analyse EGPA	154
3.	Etude de la réparation de l'uracile par les cellules CHO de la lignée XRS ₅	156
a	Analyse par électrophorèse (EGPA).....	156
b	Analyse de l'activité enzymatique de réparation d'extraits nucléaires par Fluorescence .	157
c	Comparaison EGPA et Fluorescence.....	158
III.	Inhibition spécifique de la réparation de l'uracile au sein d'extraits bactériens ou cellulaires	159
A.	Effets de l'inhibition de l'UNG au sein d'extraits bactériens de <i>E.coli</i>	159
1.	Analyse par Fluorescence	159
2.	Effet dose réponse d' UGi sur la réparation de l'uracile par des extraits de <i>E.coli</i>	161
B.	Inhibition de l'UNG au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa	162
IV.	Suivi simultané par Fluorescence de plusieurs activités de réparation d'un mélange de sondes par des extraits de cellules HeLa.....	165

Mesure de plusieurs activités enzymatiques de réparation à l'aide des sondes fluorescentes à partir d'enzymes purifiées ou d'extraits cellulaires

Nous avons précédemment validé la méthode de détection par fluorescence comme un outil de détection des activités de réparation des lésions de l'ADN prises en charge par le BER. La démarche jusqu'alors utilisée a consisté à suivre l'apparition d'un signal correspondant à une interaction enzyme substrat spécifique. Nous voulons dans une première étape, valider le principe de cette méthode en comparant les constantes cinétiques obtenues par analyse des signaux de fluorescence avec celles issues d'analyse par radiomarquage existant dans la littérature. Une deuxième étape consistera ensuite à établir la validité d'une mesure simultanée de fluorescence, issue de l'incubation d'enzymes différentes sur un mélange de sondes lésées. Nous avons choisi deux sondes « hairpin » : la 8-oxodGuo marquée par la fluorescéine (FLUO-dT), puisque nous disposons dorénavant de nombreuses données en fluorescence concernant sa stabilité et ses réactions vis-à-vis de la Fpg ; la sonde Tg Rhod, sonde contenant le glycol de thymine et marqué par la rhodamine (TAMRA) (Bien que les spectres d'absorption du Dabcyl et du TAMRA ne se recouvrent pas, l'extinction de fluorescence du fluorophore par le « quencher » peut quand même exister grâce à des processus physiques de transfert d'électrons (Arkin *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 1996; Packard *et al.*, 1996)). Nous cherchons à établir le bien-fondé de l'application de notre méthode en tant qu'outil de biologie fondamentale et de technique d'enzymologie.

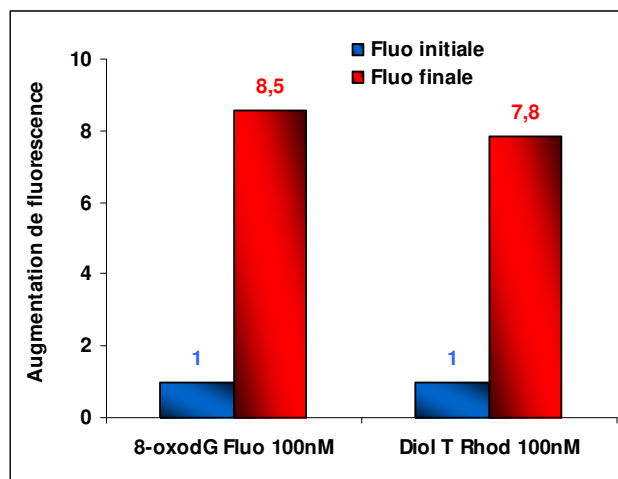
I. Etude des cinétiques de réparation en deux couleurs : Réparation des sondes Tg Rhod et 8-oxodGuo Fluo par des enzymes purifiées

A. Action de la Nucléase P1

L'étude de cinétique enzymatique de lésions de l'ADN par fluorescence revêt un attrait particulier en terme de facilité. En effet, le balayage systématique aux deux longueurs d'onde d'émission des fluorochromes utilisés (λ_{em} FLUO-dT = 525 nm et λ_{em} TAMRA = 580 nm) permet le suivi en direct et simultané des réactions sur les deux sondes lésées. Ainsi, pour un mélange de sondes données (100 nM Tg Rhod et 100 nM 8-oxodGuo Fluo), il devient aisé

d'analyser les cinétiques de digestion par la Nucléase P1 par spectrofluorimétrie (LS 50 B). La Figure 70 illustre les augmentations maximales de fluorescence obtenues pour ces sondes lors de leur dégradation par une enzyme non spécifique telle que la Nucléase P1.

Figure 70: Fluorescence du mélange de sondes 8-oxodGuo Fluo et Tg Rhod (100 nM) après incubation avec 0,05 unité de Nucléase P1



Ces résultats montrent une augmentation de fluorescence simultanée pour les deux sondes d'un facteur ≈ 8 au cours de la réaction de digestion enzymatique. Ces valeurs confirment celles précédemment déterminées et prouve la digestion totale des deux sondes. Cette valeur ne saurait être dépassée par une l'action d'une glycosylase spécifique sur ces mêmes sondes.

B. Action des glycosylases spécifiques des lésions sélectionnées

1. Spécificité de détection : Incubation avec l'Endonucléase III

Le mélange des deux sondes Tg Rhod et 8-oxodGuo Fluo (100 nM) est incubé en présence de 410 nM d'Endo III. Les intensités de fluorescence aux deux longueurs d'ondes d'émission d'intérêt (FLUO-dT et TAMRA) sont mesurées sur une période de 2h. Les résultats (Figure 71 et Figure 72) expriment le facteur d'augmentation du signal pour chaque sonde et montrent le profil des courbes obtenues.

Figure 71: Courbes de réparation enzymatique du mélange des sondes Tg Rhod et 8oxodGuo Fluo (100 nM) incubé avec Endo III (410 nM) suivies par LS 50B

Figure 72: Augmentation de fluorescence du mélange des sondes Tg Rhod et 8-oxodGuo Fluo (100 nM) incubées avec Endo III (410 nM)

Figure 71

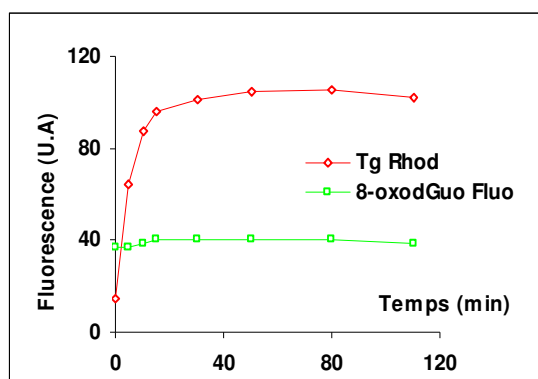
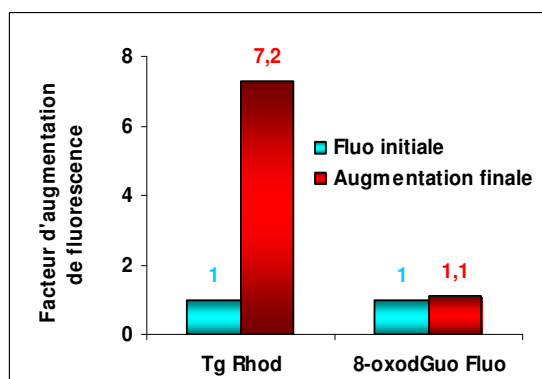


Figure 72



On retrouve une très nette augmentation de fluorescence du signal de la rhodamine, observé sur la sonde Tg Rhod (facteur 7, Figure 72) correspondant à la réaction de clivage par l'Endo III sur la lésion préférentielle, le diol de thymine. Ceci est mis en évidence par l'observation d'un plateau de fluorescence pour la courbe de détection de fluorescence obtenue en temps réel (Figure 71). En revanche, l'enzyme Endo III n'excise pas la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, insérée dans l'"hairpin" 8-oxodGuo Fluo, puisque aucun signal fluorescent n'augmente pour le FLUO-dT. Ainsi, le mélange de sondes traité par une enzyme spécifique d'une lésion permet de suivre l'évolution de la réparation de ladite lésion, au sein du mélange. Cette approche permet ainsi l'étude des spécificités de substrat des enzymes étudiées, par suivi des profils de fluorescence en temps réel.

2.Action d'une glycosylase moins spécifique : la protéine Fpg

La même démarche expérimentale est mise en œuvre sur le mélange "d'hairpins" avec une incubation effectuée en présence de Fpg. Cette enzyme reconnaît préférentiellement la 8-oxo-7,8-dihydroguanine ; elle peut toutefois exciser les diols de thymine, avec une moindre efficacité. Les résultats obtenus par incubation du mélange de sondes avec Fpg puis Endo III montrent le facteur d'augmentation du signal fluorescent pour chaque sonde ainsi que le profil des courbes cinétiques (Figure 73 et Figure 74).

Figure 73: Courbes de fluorescence issues de la réparation des sondes en mélanges par Fpg (165 nM)

Figure 74: Variations de fluorescence des sondes en mélanges (Tg Rhod et 8-oxodGuo Fluo, 300 nM) après incubation avec la protéine Fpg (165 nM)

Figure 73

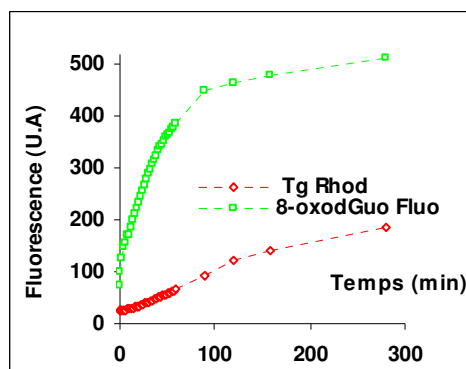
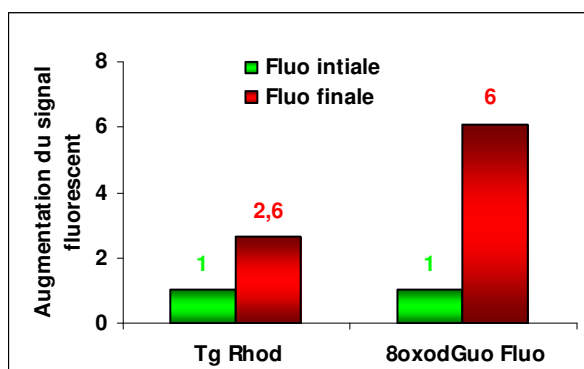


Figure 74



On observe une forte augmentation de l'intensité de fluorescence pour le signal correspondant à l'«hairpin» 8-oxodGuo Fluo. La lésion 8-oxo-7,8-dihydroguanine est clivée efficacement par la Fpg. De plus, on dénote également une augmentation du signal de fluorescence de la rhodamine, qui, quoique de moindre amplitude, est significative, indiquant ainsi que la lésion Tg est également clivée par la Fpg. Les plateaux de fluorescence indiquent un facteur d'augmentation maximal de 6 pour la fluorescence FLUO-dT (comparable au facteur 7 mesuré pour l'«hairpin» Tg Rhod traité par l'Endo III) contre 2,5 pour la rhodamine, en point final de lecture. On peut également souligner le fait que les amplitudes d'augmentation maximale de fluorescence sont indépendantes de la concentration initiale en sonde. L'expérience de digestion par Endo III a été effectuée sur 100 nM du mélange de sondes, alors que dans l'expérience présentée, la concentration de substrat est de 300 nM.

3. Confirmation de la spécificité des enzymes vis-à-vis des sondes lésées par post marquage radioactif et analyse EGPA

Afin de s'assurer de la spécificité d'action des enzymes détectées par fluorescence sur les deux substrats, un marquage au $[^{32}\text{P}]$ des sondes 8-oxodGuo Fluo et Tg Rhod, incubées chacune avec Fpg ou Endo III est effectué. Chacune des deux «hairpins» est alors incubée pendant 30 min avec un excès de Fpg (165 nM) ou un excès d'Endo III (165 nM) à une température de 37°C. Les résultats de l'analyse EGPA sont représentés dans la Figure 75 et la quantification des activités de coupure en résultant, dans la Figure 76.

Figure 75: Analyse EGPA des sondes en présence des protéines Fpg et Endo III : Sélectivité des enzymes vis-à-vis de leurs substrats

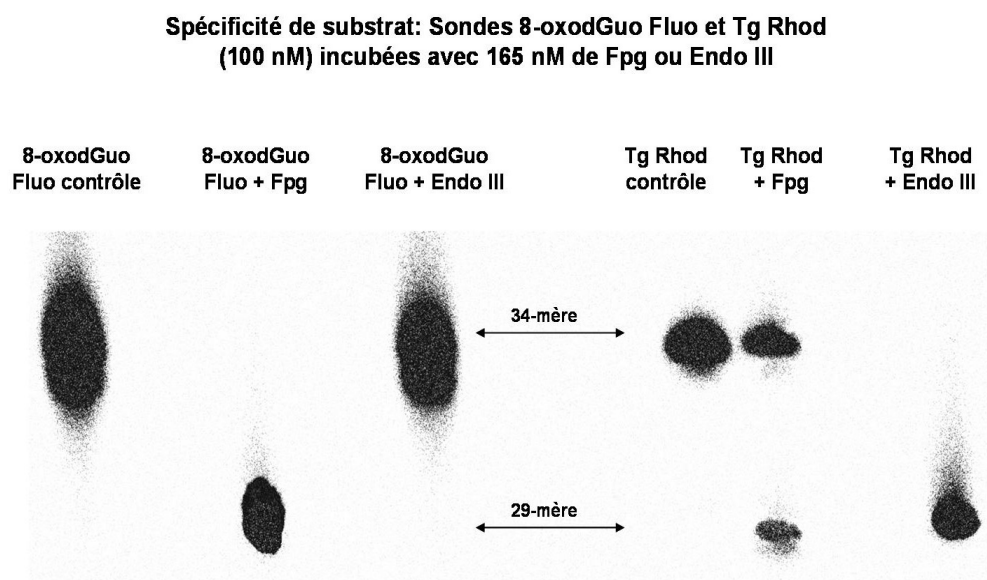
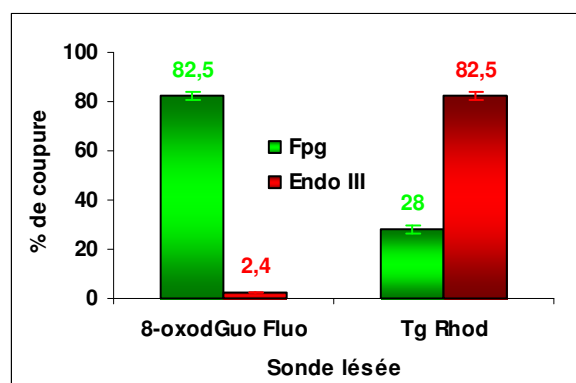


Figure 76: Quantification par EGPA de la coupure des sondes « hairpin » Tg Rhod et 8-oxodGuo Fluo (100 nM) par les enzymes Fpg et Endo III (165 nM)



Ces résultats mettent en évidence la spécificité des enzymes pour leurs substrats préférentiels. En effet, on note le pourcentage d'excision élevé (82,5 %) de la lésion 8-oxo-7,8-dihydroguanine par la protéine Fpg, tout comme pour le glycol de thymine par l'endonucléase III (Figure 76). L'analyse EGPA met également en évidence une activité d'excision significative du glycol de thymine par Fpg (Figure 75) ; en effet un fragment plus court, correspondant à celui généré par l'excision de la base endommagée apparaît sur le gel, après électrophorèse. La quantification résultante donne une valeur de l'ordre de 28 % d'activité d'excision dans les conditions

expérimentales. Ces résultats confirment à la fois la spécificité d'Endo III pour le glycol de thymine (coupure résiduelle de 2,5 % sur « l'hairpin 8-oxodGuo Fluo », due au bruit de fond) et la capacité pour Fpg de reconnaître la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (coupure quantitative pour seulement 30 minutes d'incubation), mais aussi le glycol de thymine (28 % dans nos conditions expérimentales). Ainsi, les résultats obtenus par détection fluorescente sont confirmés par ceux obtenus par l'analyse radioactive : il devient possible de suivre une activité de coupure de façon spécifique grâce à nos sondes et à l'analyse par fluorescence. Cette méthode appliquée aux sondes "hairpins", modifiées de façon spécifique permet une détection spécifique en fonction des glycosylases utilisées, mais également en jouant sur les longueurs d'ondes des fluorochromes greffés sur les sondes. Ainsi, à une couleur (une longueur d'onde donnée) correspond une activité de réparation unique et une seule constante cinétique.

C. Accès aux paramètres cinétiques enzymatiques grâce à l'analyse par fluorescence

La catalyse enzymatique d'une réaction biochimique (du type enzyme de réparation de l'ADN excisant son substrat) implique la formation d'un complexe enzyme substrat. Cette réaction peut être mise en évidence par la vitesse d'apparition du produit de la réaction dans le milieu. Cette dernière, étudiée en fonction de la quantité de substrat peut être michaelienne si la courbe résultante est hyperbolique, ou sigmoïde (cas de enzymes allostériques, mécanisme coopératif). Les expériences précédemment exposées nous ont permis de déterminer les vitesses de réparation des enzymes utilisées grâce à la méthode par fluorescence. A ces fins et en fonction des graphes obtenus, nous avons fixé les conditions pour obtenir des signaux de fluorescence linéaires dans les premières minutes de la réaction afin d'accéder à la vitesse initiale V_i de chaque enzyme. Ainsi les concentrations d'enzymes ont été fixées à 85 nM (en moyenne) et plusieurs concentrations de substrats ont alors été utilisées. L'analyse a d'abord débuté par la détermination des paramètres cinétiques de la Fpg lors de son action sur l'"hairpin" 8-oxodGuo Fluo. Les concentrations en substrats étudiées se sont échelonnées entre 50 nM et 300 nM.

1. Détermination des paramètres cinétiques de la Fpg

Après traitement et exploitation des données expérimentales mises à disposition, une détermination graphique via la représentation en double inverse de Lineweaver et Burke (Figure 77 : $1/V=f(1/S)$), pour l'accès graphique aux paramètres K_m et V_{max} a pu être effectuée. Les valeurs ont alors été corrélées aux résultats traités par un logiciel adapté à l'étude de cinétiques enzymatiques (Figure 78: $V_i=f(S)$; Logiciel Origin), ainsi qu'aux valeurs issues de la littérature (Figure 79).

Figure 77: Représentation en double inverse de Lineweaver-Burke des résultats obtenus d'après l'analyse des expériences présentées dans la figure 48

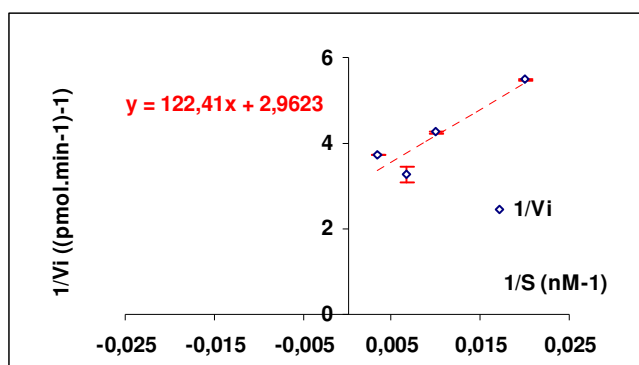
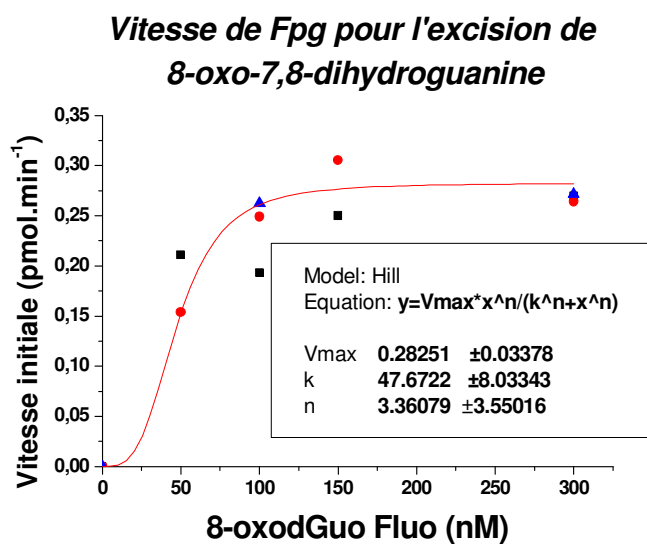


Figure 78: Représentation de $V_i=f(S)$ d'après les résultats obtenus dans les expériences présentées dans la figure 48 et traités par le logiciel Origin



La détermination de paramètres enzymatiques par la méthode graphique en double inverse peut être évidemment entachée d'une certaine erreur. Les paramètres obtenus ont été calculés d'après l'équation de la droite. Ainsi, le V_{\max} a été évalué à $3,3 \text{ nM min}^{-1}$ et le rapport K_{cat}/K_m à $9,6 \cdot 10^{-3}$. Le logiciel Origin, d'après la plus proche corrélation avec des données à des modèles cinétiques (Figure 78), donne un V_{\max} de $2,8 \text{ nM min}^{-1}$ et un rapport K_{cat}/K_m de $8,7 \cdot 10^{-3}$. On peut noter que ces derniers sont du même ordre de grandeur que ceux déterminés graphiquement.

Enfin, il est intéressant de signaler que les valeurs trouvées par fluorescence sont voisines de celles rapportées dans la littérature (étude de paramètres cinétiques par radioactivité et EGPA). La Figure 79 représente un tableau comportant les valeurs trouvées dans deux publications ainsi que la moyenne de celles issues de la détection par fluorescence (Duarte *et al.*, 2000 ; Tchou *et al.*, 1994).

Figure 79: Comparaison des différents paramètres enzymatiques

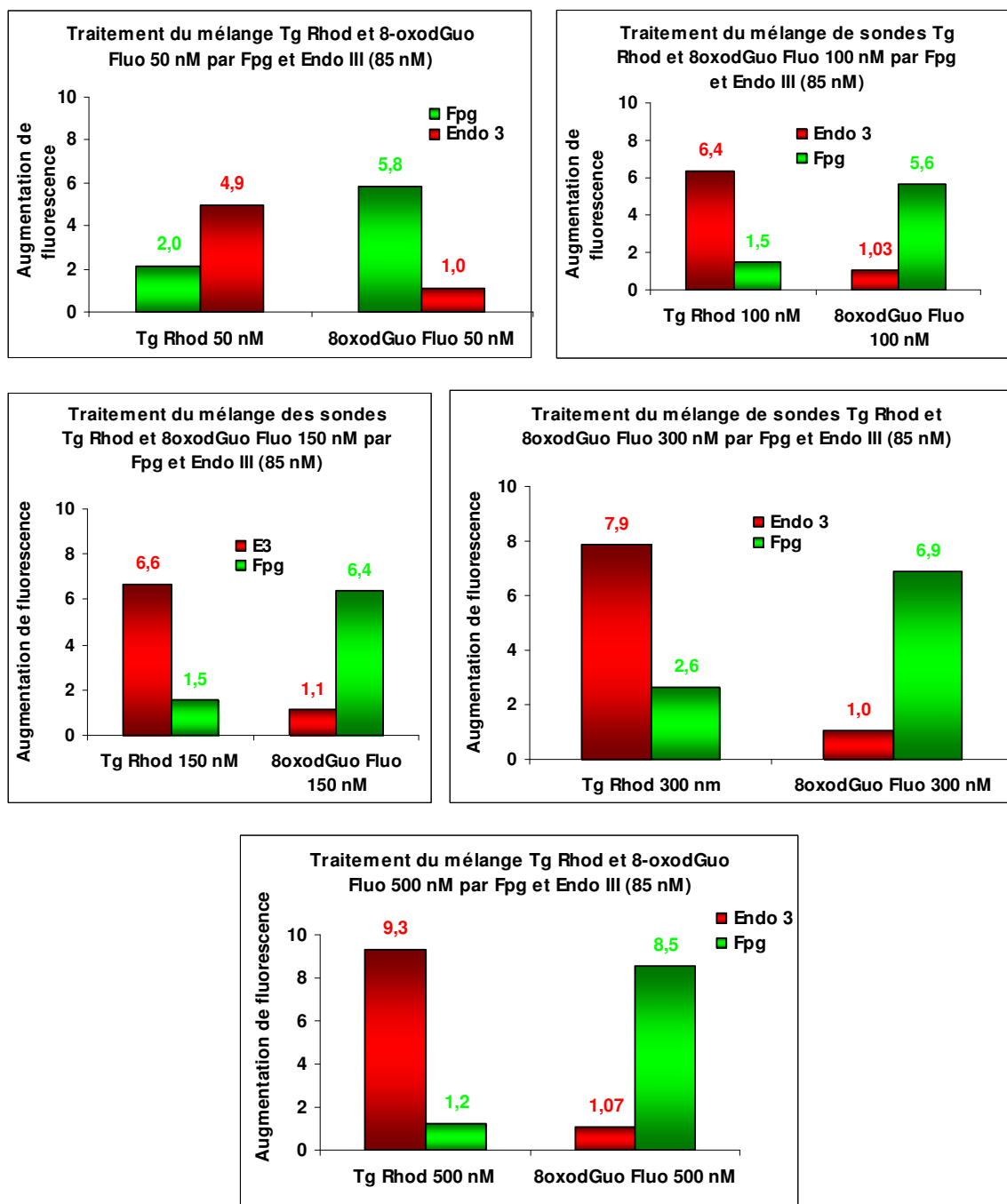
Enzyme	Substrat	$V_{\max} (\text{nM} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_m (\text{nM})$	$K_{\text{Cat}} (\text{min}^{-1})$	$K_{\text{Cat}}/K_m (\text{min}^{-1} \text{nM}^{-1}) \times 10^{-3}$
Fpg (Tchou et al)	8-oxoGua : C	$2,3 \pm 0,3$	$14 \pm 0,3$	$0,13 \pm 0,3$	$9,3 \pm 0,3$
Fpg (Duarte et al)	8-oxoGua : C	$4,2 \pm 2,5$	134 ± 46	$1,3 \pm 0,07$	$9,7 \pm 32$
Fpg (FRET)	8-oxoGua : C	$3,3 \pm 0,07$	$39,8 \pm 15,6$	$0,37 \pm 0,07$	$9,25 \pm 0,12$

Les valeurs issues des publications proviennent d'études par analyse radioactives. La valeur que nous avons calculée est très proche de celle de la littérature. Ainsi donc, la méthode développée en fluorescence semble être valide pour la mesure et la quantification d'activité enzymatique de réparation de sondes lésées.

2. Paramètres cinétiques de Fpg et d'Endonucléase III

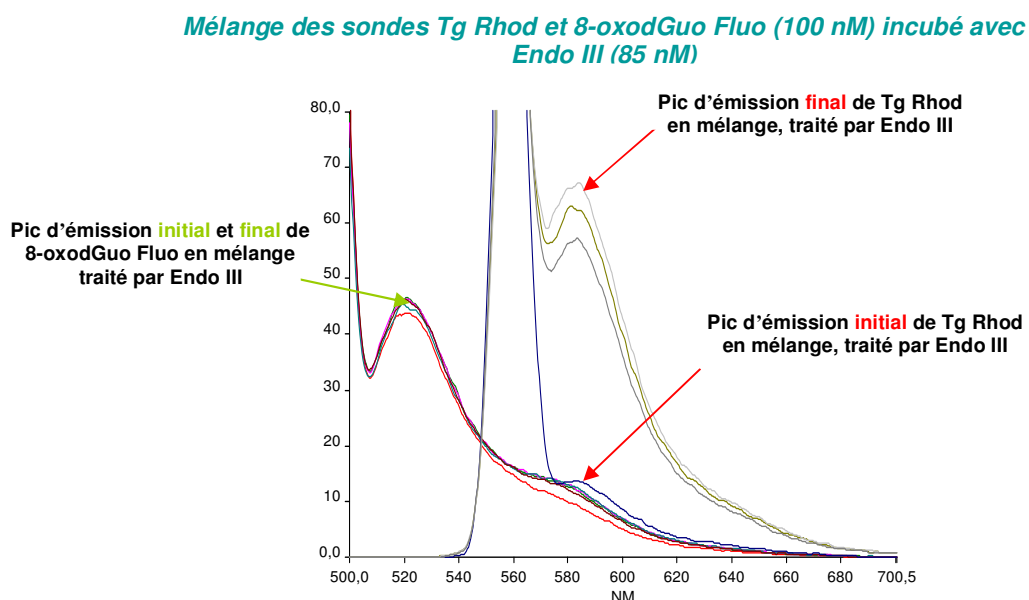
En utilisant la même approche que dans les expériences précédentes, l'étude a été étendue aux "hairpins" Tg Rhod et 8-oxodGuo Fluo, de façon à déterminer les constantes cinétiques de chacune des enzymes de réparation des lésions. Plusieurs concentrations du mélange d'"hairpins" ont été incubées (50 nM, 100 nM, 150 nM, 300 nM et 500 nM) successivement avec Fpg puis Endo III. La Figure 80 représente les 5 groupes de résultats pour les concentrations étudiées, montrant les augmentations de fluorescence pour chacune des 2 "hairpins" et pour chaque enzyme utilisés.

Figure 80: Résumé sous forme d'histogrammes, des différentes expériences permettant l'accès aux paramètres enzymatiques des enzymes étudiées



Comme précédemment, on constate que le rapport de fluorescence maximal obtenu par l'action des glycosylases varie peu en fonction de la concentration initiale en substrat (facteur d'augmentation de fluorescence = 7 en moyenne). Pour chaque condition, une analyse spectrale en temps réel nous a permis de conclure que la réaction était terminée. La Figure 81 représente un exemple de suivi par détection de fluorescence d'une cinétique dans ces conditions.

Figure 81: Analyse spectrale de la réaction enzymatique suivie en directe (lecture par LS 50B)

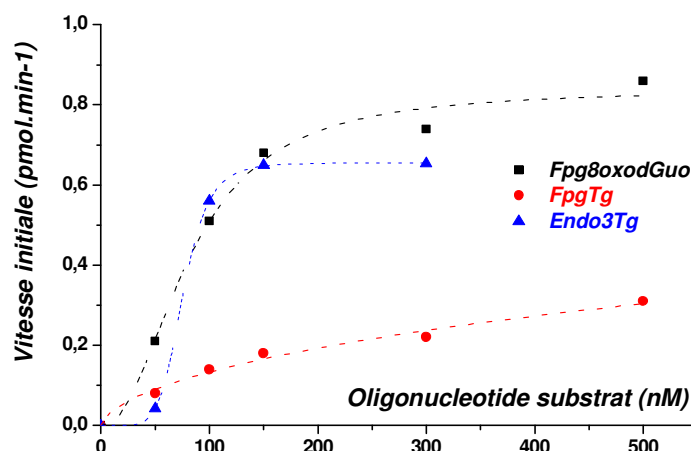


On note dans cette figure la grande amplitude entre le signal initial et final de la rhodamine (obtenu après digestion de l'«hairpin» Tg Rhod par Endo III). On observe aussi l'absence de variation des signaux de fluorescence de la fluorescéine (l'«hairpin» 8-oxodGuo Fluo n'est donc pas substrat d'Endo III). Les résultats obtenus sont en parfait accord avec la spécificité de substrat des deux enzymes utilisées.

Dès lors, l'exploitation des données obtenues en temps réel par mesure fluorescente a permis l'obtention des paramètres cinétiques pour les deux enzymes agissant sur le mélange. Le logiciel de traitement de données cinétiques a permis de déterminer la valeur de V_{max} en fonction des concentrations croissantes de substrats pour les couples enzyme-susbtrat : Endo III sur Tg Rhod, Fpg sur 8-oxodGuo Fluo, mais aussi Fpg sur Tg Rhod. Ces courbes sont rapportées dans la Figure 82.

Figure 82: Affinité de Fpg et Endo III pour leur substrat (Exploitation des données par le logiciel Origin)

Vitesse initiale des enzymes Fpg et Endo III sur les lésions glycol de thymine et 8-oxo-7,8-dihydroguanine



Les courbes apportent des informations sur les vitesses initiales de clivage des lésions étudiées par chacune des 2 enzymes. Ainsi on remarque que les courbes de clivage de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine par Fpg, et de l'Endonucléase III sur Tg semblent obéir à des cinétiques michaeliennes. La courbe concernant la vitesse d'excision de Tg par la Fpg présente un profil très différent, reflétant la très faible affinité de l'enzyme pour cette lésion ou une inhibition par excès de substrat.

Les paramètres de chaque enzyme ont été déterminés et comparés avec des données de la littérature (Figure 83 et Figure 84).

Figure 83: Constantes enzymatiques de la Fpg, mesurées par fluorescence, en utilisant deux substrats : la sonde « hairpin » 8-oxodGuo Fluo et la sonde « hairpin » glycol de thymine

Enzyme	Substrat	Vmax (nM.min ⁻¹)	Km (nM)	KCat (min ⁻¹)	KCat/Km (min ⁻¹ nM ⁻¹)	Rel KCat/Km
Fpg (Fluo.)	Tg : A	0,013	3,88 10 ⁻³	1,63	0,42 10 ⁻³	0,0454
Fpg (Fluo.)	8-oxoGua:C	3,3±0,07	39,8±15,6	0,37± 0,07	9,25 10 ⁻³ ±0,12 10 ⁻³	1

La comparaison du rapport relatif Kcat/Km de l'excision par Fpg des deux lésions étudiées montre que l'enzyme a une affinité environ 22 fois supérieure pour la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (1/0,0454=22) comparativement au diol de thymine. Cette valeur est similaire à celle précédemment rapportée (≈ 20) par Purmal et al. (Purmal *et al.*, 1998).

Figure 84: Constantes enzymatiques de Endo III mesurées par Fluorescence pour le substrat Thymine glycol

Enzyme	Substrat	Vmax (pmol.min ⁻¹ .ng ⁻¹)	Km (μM)	Vmax/Km
Endo III (D'Ham et al., 1999)	Tg : A	0,028	0,66	0,0424
Endo III (Fluorescence)	Tg : A	0,0028	0,097839	0,0286

Les valeurs obtenues pour l'enzyme Endo III diffèrent environ d'un facteur 10 (par exemple, la valeur des Vmax). Aussi, ne peut on pas conclure à la similarité des résultats. On peut remettre en cause plusieurs paramètres expérimentaux pour tenter d'expliquer ces différences, à commencer par la nature du substrat. Celui utilisé par D'Ham et al. (D'Ham *et al.*, 1999) est un duplex linéaire, alors que notre substrat à une structure en épingle à cheveu. Cet effet de séquence peut être à l'origine de la différence entre nos valeurs et celles reportées dans la littérature. Il se peut également que la protéine Endo III (commerciale) ne soit pas intégralement fonctionnelle et pure, induisant donc un biais non négligeable lorsqu'on exprime les résultats par rapport à la quantité d'enzyme (sous-entendue : fonctionnelle). Toutefois l'efficacité de l'excision du diol de thymine par Endo III déduite de la valeur Vmax/Km que nous avons estimé dans le présent travail, est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans la littérature (0,02 pour la méthode par fluorescence vs 0,04 par radioactivité et suivi par EGPA). Notre méthode permet donc non seulement de détecter et de quantifier une activité enzymatique en direct et en temps réel, mais aussi, comme nous venons de le démontrer, d'accéder aux paramètres cinétiques des enzymes, de manière plus rapide que par les techniques conventionnelles, à condition toutefois de pouvoir séparer les signaux de manière efficace. Ainsi on peut envisager l'utilisation de la méthode de suivi de l'inhibition du « quenching » de fluorescence en tant qu'outil d'étude d'enzymologie fondamentale.

II. Etude de l'activité de réparation des lésions présentes au sein d'extraits cellulaires : exemples de l'uracile ou de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine

Les mesures effectuées jusqu'à présent ont permis de démontrer la validité de notre approche et du support proposé : l'utilisation de sondes nucléiques lésées marquées par des groupements chromophores pour l'étude *in vitro* de la réparation enzymatique de l'ADN. Les sondes pourraient, à terme, être utilisées comme outil de test diagnostique en analyse clinique, mais leur validation en milieu biologique reste à faire. Seules des enzymes purifiées et totalement identifiées en terme de concentration ou d'activité ont été utilisées. Ces mêmes enzymes, contenues dans des extraits cellulaires bactériens ou eucaryotes pourraient se comporter de façon sensiblement différente et les sondes pourraient subir l'action d'autres enzymes. C'est pourquoi nous avons étudié la capacité de nos sondes à mettre en évidence un processus de réparation enzymatique spécifique dans ces milieux complexes. Ceux-ci peuvent comporter à la fois plusieurs enzymes effectrices, comme plusieurs facteurs potentiellement inhibiteurs.

A. Analyse d'extraits cellulaires bactériens d'*Escherichia coli*

1. Analyse de l'activité de réparation de l'uracile par Fluorescence

Nous avons tout d'abord utilisé un extrait bactérien supposé posséder une activité fapy glycosylase et uridine glycosylase. Les variations de fluorescence ont été suivies sur le lecteur microplaque. Pour chaque expérience, la température est réglée à 37°C et la fluorescence est suivie en continu. Les sondes «hairpins» en solution (100 nM) sont incubées en présence d'extraits bactériens à différentes concentrations (1 µg, 2,5 µg, 5 µg et 10 µg dans un volume final de 100 µl). Des puits sont dévolus aux témoins positifs (digestion totale de «l'hairpin» dGuo Fluo par la Nucléase P1 (0,2 U) ; digestion spécifique et totale de «l'hairpin» dUrd Fluo par action combinée de UNG (0,2 U) et Fpg (65 nM)). La Figure 85 illustre l'action d'extraits de *E.coli* sur «l'hairpin» dGuo Fluo (c'est-à-dire la dégradation de la sonde). La Figure 86 montre l'action des extraits sur dUrd Fluo, c'est-à-dire l'ensemble de la dégradation non spécifique et de

la réparation. La Figure 87 illustre la différence entre ces deux mesures, nous indiquant la réparation spécifique.

Figure 85: Cinétique de dégradation de la sonde dGuo Fluo (100 nM) incubée en présence d'extraits de *E.coli* à différentes concentrations

Figure 86: Cinétique de dégradation/réparation de la sonde dUrd Fluo (100 nM) incubée en présence d'extraits de *E.coli* à différentes concentrations

Figure 85

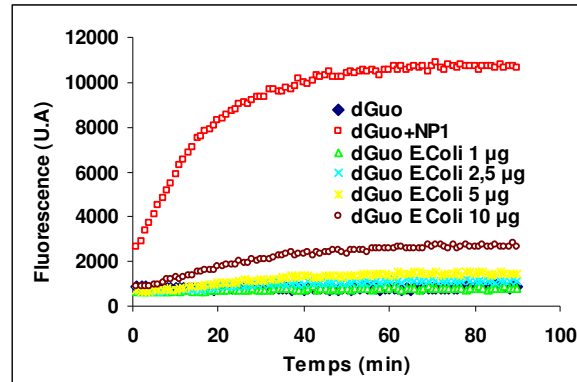


Figure 86

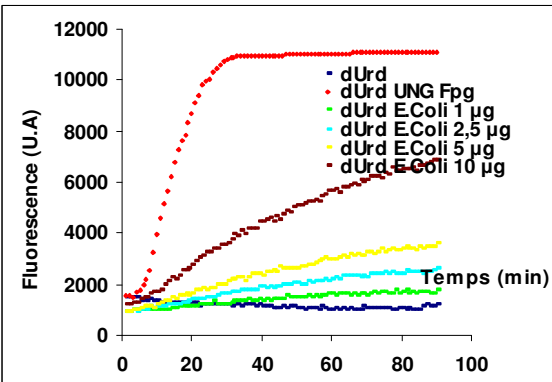
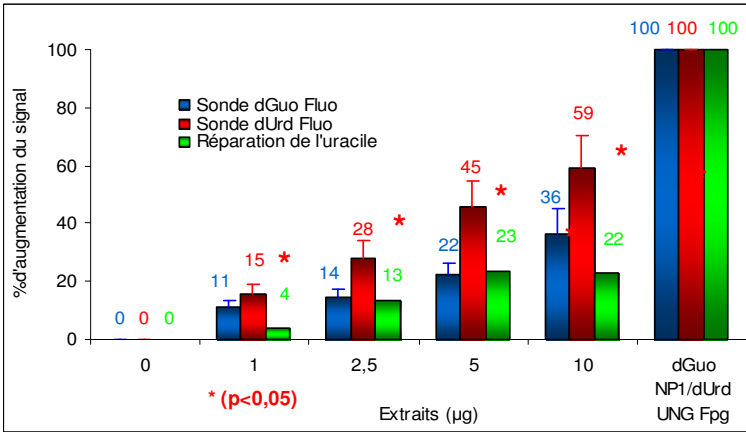


Figure 87: Mise en évidence de la réparation de l'uracile par un extrait de *E.coli*



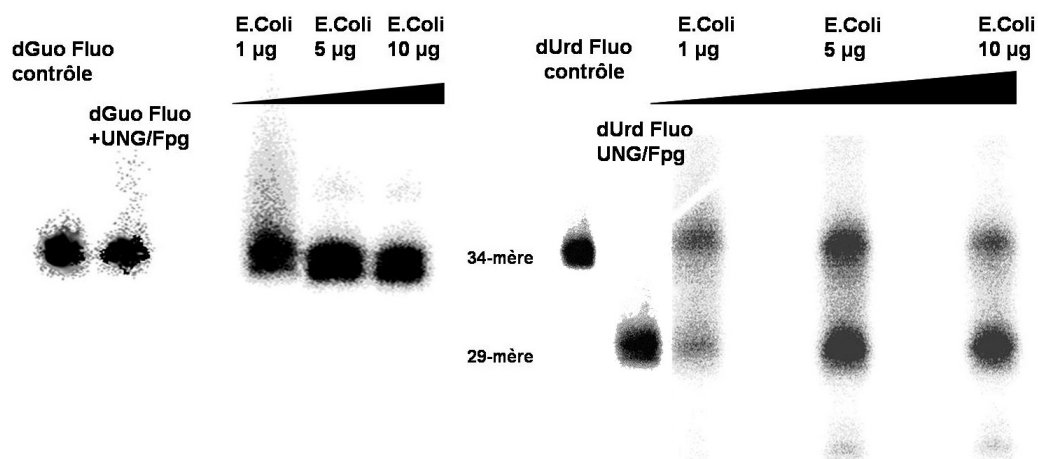
Les conclusions de ces expériences sont les suivantes : la Figure 85 met en évidence le niveau de dégradation non spécifique, imputable à l’activité des nucléases présentes au sein de l’extrait bactérien et qui apparaît dépendre de la quantité d’extrait. En effet, c’est à partir de 5 µg d’extraits (dans 100 µl) que les nucléases commencent à avoir un effet notable sur le signal de fluorescence (augmentation de signal de 22 % pour 5 µg d’extraits et de 36 % pour 10 µg). Cette dégradation non spécifique est un paramètre important à prendre en compte pour la détermination du signal spécifique lié à la réparation, au sein de l’extrait, de l’uracile sur «l’hairpin» dUrd Fluo. Dans la Figure 86, on rapporte les variations de fluorescence dues à

l'action d'extraits de *E.coli* sur «l'hairpin» dUrd Fluo dans les mêmes conditions. Les pentes des tangentes à l'origine sont plus importantes que dans la Figure 85, reflétant une activité de coupure-excision plus intense des enzymes bactériennes. Le signal fluorescent final apparaît également plus intense, avec une relation de dépendance avec la quantité d'extrait; une augmentation de la quantité d'extrait se traduit par l'augmentation de fluorescence de «l'hairpin» dUrd Fluo. La différence de fluorescence entre les deux sondes, présentée dans la Figure 87 et symbolisée par les colonnes vertes, correspondrait ainsi à l'activité de réparation spécifique de la lésion uracile sur «l'hairpin», par les enzymes bactériennes. L'activité de réparation de l'uracile par l'extrait de *E.coli* montre effectivement un effet dose-réponse liant la quantité d'extraits de *E.coli* à la réponse fluorescente. On note qu'un plateau de fluorescence est atteint pour des doses importantes d'extraits. Dans nos conditions expérimentales et avec l'extrait bactérien utilisé, le taux de réparation de l'uracile est estimée à environ 23 %.

2. Confirmation de l'activité de réparation de l'uracile par analyse EGPA

Les extraits cellulaires totaux d'*E.coli* ont été utilisés sur les sondes «hairpins» dGuo Fluo et dUrd Fluo, marqués radioactivement en 5', à une concentration de 50 nM. Les extraits, concentrés initialement à 6 µg/µl ont été dilués pour atteindre des quantités variant de 1 µg à 10 µg (volume final de réaction 10 µl). Le temps d'incubation est de 30 minutes à 37 °C. En fin de réaction, les mélanges réactionnels sont analysés par électrophorèse (cf. Figure 88).

Figure 88: Analyse EGPA des sondes lésées fluorescentes marquées au [γ^{32} -P] incubées en présence d'extraits bactériens



On note dans cette figure l'absence de dégradation massive et non spécifique par les nucléases présentes dans les extraits. En effet, la quantification des tâches radioactives indique une dégradation non spécifique moyenne de 13 % pour «l'hairpin» dGuo Fluo (9 % pour 1 ng, 12 % pour 5 ng et 17 % pour 10 ng). Cette valeur sera à déduire des pourcentages de coupure observés pour la sonde dUrd Fluo, traitée dans des conditions similaires. «L'hairpin» dGuo Fluo traitée par UNG ou Fpg reste intacte, alors que «l'hairpin» dUrd Fluo traitée par le mélange UNG/Fpg donne lieu à la formation d'un fragment correspondant au 29-mère issu de la coupure spécifique des glycosylases au niveau de l'uracile. Après incubation avec les extraits, la sonde dUrd Fluo fait apparaître un fragment plus court, migrant également au niveau du 29-mère attendu. La quantification des spots radioactifs est résumée dans le tableau ci dessous (Figure 89).

Figure 89: Tableau de quantification de la réparation de sonde dUrd Fluo (50 nM) par les extraits de *E.coli* (témoin de dégradation non spécifique : sonde dGuo Fluo 50 nM) après analyse EGPA

Conditions	Quantification de l'activité de coupure de la sonde « hairpin » dUrd Fluo (%)	Réparation spécifique de l'uracile (déduction du bruit de fond et de la dégradation non spécifique) (%)
dUrd Fluo contrôle	≈2-4	0
UNG/Fpg	94,3	≈90
1 µg <i>E.coli</i>	44,7	35,7
5 µg <i>E.coli</i>	56,2	44,2
10 µg <i>E.coli</i>	82,4	65,4

L'analyse des résultats obtenus par EGPA nous permet de conclure sur quelques points fondamentaux. Tout d'abord, l'activité de coupure non spécifique des nucléases contenues dans l'extrait n'est pas négligeable. L'analyse par fluorescence nous a également montré que cette activité augmente en fonction de la dose d'extrait utilisée. De plus, une augmentation de la quantité d'extrait entraîne une augmentation du taux de réparation spécifique de la lésion uracile. En effet, l'intensité du signal correspondant au fragment 29-mère est directement corrélée à la quantité d'extrait utilisée, cependant de façon non linéaire. Enfin, il est intéressant de noter que le taux de réparation de 50 nM de sonde dUrd Fluo lésée (analyse par EGPA) est bien plus important (de 35 à 65 %) que celui de 100 nM de cette même sonde incubée à une concentration de 100 nM dans les mêmes conditions et détecté par Fluorescence (même quantité d'extrait et quantification par fluorescence de 4 à 23 %). Ceci pourrait traduire l'effet de saturation des glycosylases présentes dans l'extrait de *E.coli*.

Les résultats ainsi obtenus confirment a posteriori l'hypothèse sur laquelle nous avons fondé notre démarche expérimentale : les glycosylases contenues dans les extraits cellulaires bactériens

sont capables de couper leur substrat préférentiel de façon spécifique. Cette activité s'avère détectable et quantifiable par analyse fluorescente en temps réel. Il apparaît ensuite logique d'étudier leur activité dans des extraits de mammifères.

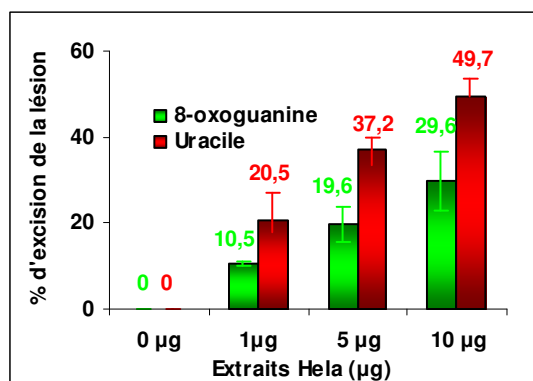
B. Extraits nucléaires de cellules de Mammifères : Extraits de cellules HeLa et de lignée cellulaire CHO XRS₅

Une des applications majeures de nos sondes réside dans leur utilisation en recherche clinique comme outil d'identification et de mesure d'activité de réparation enzymatique de l'ADN cellulaire. Nos sondes ont donc été testées sur des extraits nucléaires de lignée cellulaire de cellules HELA ou CHO XRS₅ dans le but de prouver leur aptitude à reporter des activités de réparation dans les extraits de mammifères.

1. Excision de l'uracile et de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine par des extraits commerciaux de cellules HeLa mise en évidence par Fluorescence

Les sondes 8-oxodGuo Fluo et dUrd Fluo (100 nM) ont été incubées avec différentes quantités d'extraits nucléaires de cellules HeLa (*Hela Scribe*, PROMEGA ; respectivement 1 µg, 2,5 µg, 5 µg et 10 µg dans un volume final de 100 µl) et la fluorescence a été mesurée à l'aide du lecteur microplaque VICTOR (Perkin Elmer). La sonde dGuo Fluo a également subi le même traitement afin de déterminer le taux de dégradation non spécifique du à l'activité des nucléases contenues dans l'extrait. Ces valeurs (similaires à celles obtenues précédemment lors du traitement par des extraits de *E.coli* et de l'analyse par fluorescence) ont été soustraites aux résultats obtenus pour les deux autres sondes dUrd Fluo et 8-oxodGuo Fluo. Les résultats relatifs à la réparation spécifique de l'uracile ou de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine sont présentés dans la Figure 90.

Figure 90: Pourcentage d'excision des lésions uracile et 8-oxo-7,8-dihydroguanine par un extrait de cellules HeLa ; quantification par FRET, suivie sur lecteur microplaque Victor 3 (Perkin Elmer)

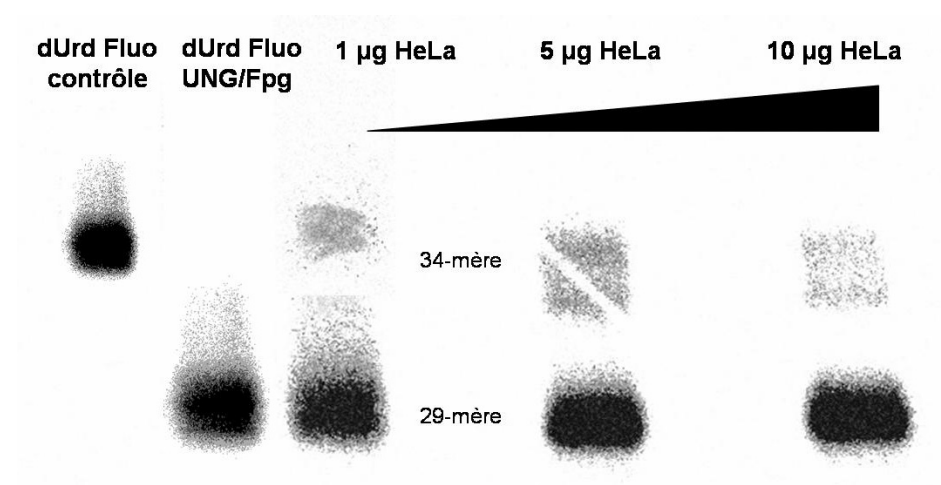


L'analyse des résultats présentés dans cette figure permet de conclure sur plusieurs points : tout d'abord, comme précédemment décrit, on note la corrélation entre la valeur du signal fluorescent et la quantité d'extraits de cellules HeLa utilisée pendant l'incubation avec les deux sondes substrats. En effet, la valeur du pourcentage d'excision spécifique de la lésion augmente avec la quantité d'extrait, qu'il s'agisse de l'excision de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine ou de l'uracile. De plus, ce test a permis de mettre en exergue la différence concernant la rapidité de réparation entre les deux lésions. Ce phénomène pourrait être lié directement aux capacités de réparation et aux activités respectives des glycosylases, à savoir hOGG1 pour la 8-oxo-7,8-dihydroguanine et le couple UNG/APE-1 pour la lésion uracile. On peut noter que la lésion uracile est plus efficacement réparée par cet extrait cellulaire dans nos conditions expérimentales ($\approx 50\%$ pour seulement 30 min d'incubation en présence de l'extrait) que la lésion 8-oxo-7,8-dihydroguanine.

2. Confirmation par analyse EGPA

Comme précédemment effectué pour vérifier l'activité spécifique d'excision par les glycosylases contenues dans les extraits de *E.coli*, un marquage des sondes dGuo Fluo et dUrd Fluo (50 nM) a été effectué et les sondes ont été incubées en présence d'extraits de cellules HeLa. L'analyse effectuée par EGPA est présentée dans la Figure 91 pour la sonde dUrd Fluo (la sonde dGuo Fluo présente le même profil de migration que pour les extraits de *E.coli* et la valeur de dégradation non spécifique demeure en moyenne similaire).

Figure 91: Analyse EGPA de la sonde dUrd Fluo marquée au [32 -P] et incubée en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa



On note, après incubation en présence des extraits, l'apparition d'un fragment plus court, migrant au niveau du 29-mère généré de façon spécifique par l'action des glycosylases pures incubées avec la sonde dUrd Fluo. Les extraits de cellules HeLa contiennent par conséquent des glycosylases, capables de reconnaître et de cliver spécifiquement la sonde substrat que nous avons synthétisée. On note que pour de faibles quantités d'extraits, la coupure de la sonde dUrd Fluo est déjà importante. Le signal correspondant au 34-mère s'estompe progressivement du gel, parallèlement à l'augmentation de la quantité d'extrait utilisée. Ceci semble renseigner sur les vitesses de réparation au sein d'un extrait : l'uracile semble être la lésion réparée de façon préférentielle par les glycosylases d'un extrait de cellules HeLa et l'UNG de cet extrait prend l'uracile en charge de façon rapide et coordonnée (indispensable activité de AP E 1 pour cliver le maillon pentose phosphate restant après la génération du site abasique). La quantification des signaux de l'analyse EGPA est rapportée dans le tableau ci-après (Figure 92).

Figure 92: Tableau de quantification de la réparation de l'uracile par des extraits de cellules HeLa

Conditions	Quantification de l'activité de coupure de la sonde dUrd Fluo (%) pour 30 min d'incubation	Réparation spécifique de 50 nM d'uracile (déduction du bruit de fond et de la dégradation non spécifique) (%)
dUrd Fluo contrôle	≈2-4	0
UNG/Fpg	94,3	≈90
1 µg HeLa	69,8	60,8
5 µg HeLa	76,3	64,3
10 µg HeLa	82,5	65,5

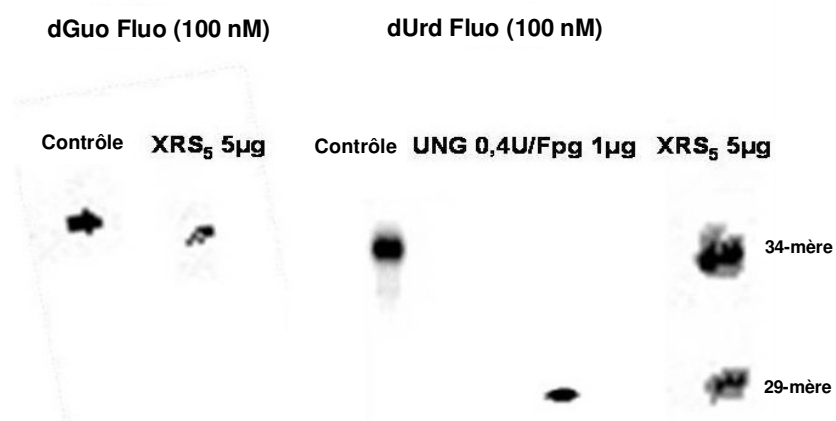
Ce tableau rend compte de la réparation de la lésion uracile, plus importante sur 50 nM (analyse EGPA) que sur 100 nM (analyse par fluorescence). En effet, sur l'exemple d'une incubation en présence de 5 µg d'extrait, la réparation spécifique de l'uracile détectée sur 50 nM est estimée à environ 60 %, alors que le taux d'excision sur 100 nM de sonde n'atteint que 37 %, lors d'une détection par fluorescence. Ici encore, l'effet de saturation des enzymes contenues dans l'extrait apparaît. Ce taux de réparation semble plafonner à une valeur avoisinant 65 % dans nos conditions expérimentales et avec ce lot spécifique d'extrait. Ceci indique que l'uracile semble être la base endommagée de l'ADN la plus rapidement et efficacement prise en charge puis éliminée par ce type d'extrait cellulaire. Ce taux de réparation peut toutefois varier d'un extrait à l'autre (variations au sein d'un lot du même échantillon) ou d'un type cellulaire à l'autre.

3. Etude de la réparation de l'uracile par les cellules CHO de la lignée XRS₅

a Analyse par électrophorèse (EGPA)

Pour ce faire, 5 µg d'extrait de cellules XRS₅ sont incubés à 37 °C pendant 40 minutes en parallèle avec la sonde dGuoFluo (100 nM) ou dUrd Fluo (100 nM). L'analyse effectuée par EGPA est présentée dans la Figure 93 ci-dessous. Elle inclut le point correspondant à «l'hairpin» dUrd Fluo traité dans les mêmes conditions par les enzymes purifiées comme témoin de digestion totale des sites uracile.

Figure 93: Sondes dGuo Fluo et dUrd Fluo (100 nM) incubées en présence d'un extrait nucléaire de cellules XRS₅

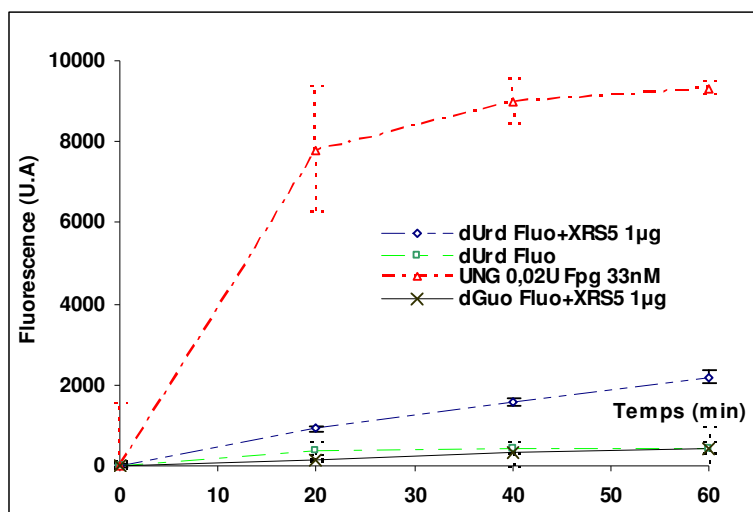


Il n'apparaît aucune dégradation non spécifique de l'hairpin dGuo Fluo par d'éventuelles nucléases susceptibles d'être présentes dans l'extrait, dans nos conditions expérimentales. La formation d'un fragment migrant comme un 29-mère issu de «l'hairpin» dUrd Fluo traité par l'extrait correspond à une coupure franche et spécifique de la sonde par l'UNG (ou l'un des systèmes équivalents de réparation de l'uracile, associés à des lyases) contenu dans l'extrait nucléaire.

b Analyse de l'activité enzymatique de réparation d'extraits nucléaires par Fluorescence

La même expérience est effectuée par mesure de fluorescence : les sondes dGuo et dUrd Fluo sont chacune incubées avec 1 µg d'extrait nucléaire. En parallèle, «l'hairpin» dUrd Fluo est mise en présence d'UNG et de Fpg afin d'obtenir un signal fluorescent correspondant à 100 % de sites uracile excisés. Les variations de fluorescence sont suivies en temps réel sur le lecteur microplaque Victor 3. Les résultats sont présentés dans la Figure 94.

Figure 94: Cinétique d'excision de l'uracile par un extrait de cellules CHO XRS₅ sur la sonde dUrd Fluo (100 nM) ; Détection par le lecteur microplaque Victor 3, Perkin Elmer



On note à nouveau l'absence de dégradation non spécifique des «hairpins» (pas d'augmentation du signal fluorescent de «l'hairpin» dGuo Fluo traité par l'extrait). Par comparaison, on note l'augmentation spécifique du signal de fluorescence de «l'hairpin» dUrd Fluo traité par l'extrait.

Ceci confirme à priori la présence d'une activité spécifique de réparation des résidus uracile de l'ADN au sein de ce type d'extrait.

c Comparaison EGPA et Fluorescence

Afin de conclure cette série d'expériences, les résultats obtenus par les deux méthodes (détection par EGPA et Fluorescence) ont été comparés. Une quantification des signaux en radioactivité et en fluorescence a été effectuée et les résultats figurent dans le tableau ci après (Figure 95).

Figure 95: Tableau comparatif des taux de coupure enzymatiques dans les extraits de cellules CHO XRS₅, analysés par EGPA et Fluorescence

Activité de coupure	GEL	FLUO
Sonde dGuo Fluo+XRS5	3,9 %	6,8 %
Sonde dUrd Fluo+XRS5	37,5 %	29,9 %

Ce tableau comparatif montre une bonne corrélation entre les deux méthodes d'analyse. La quantification sur gel étant plus sensible que celle par fluorescence, il est attendu que le pourcentage trouvé (37,5 %) soit supérieur à celui reflétant le signal fluorescent (29,9 %). Toutefois, les deux valeurs sont du même ordre de grandeur. De façon schématique, un extrait cellulaire de cellules XRS₅ est capable d'exciser les résidus uracile à un niveau de 30 % dans nos conditions expérimentales et sur cette durée de cinétique enzymatique (60 min). Le coefficient de variation pour la détection d'activité glycosylase dans les extraits nucléaires est relativement faible, étant estimé à 10 %. La bonne concordance des résultats entre EGPA et Fluorescence nous permet de conclure que nos sondes, faisant appel au principe de FRET sont des d'outils fiables et utilisables pour la recherche d'activités glycosylases au sein d'extraits.

III. Inhibition spécifique de la réparation de l'uracile au sein d'extraits bactériens ou cellulaires

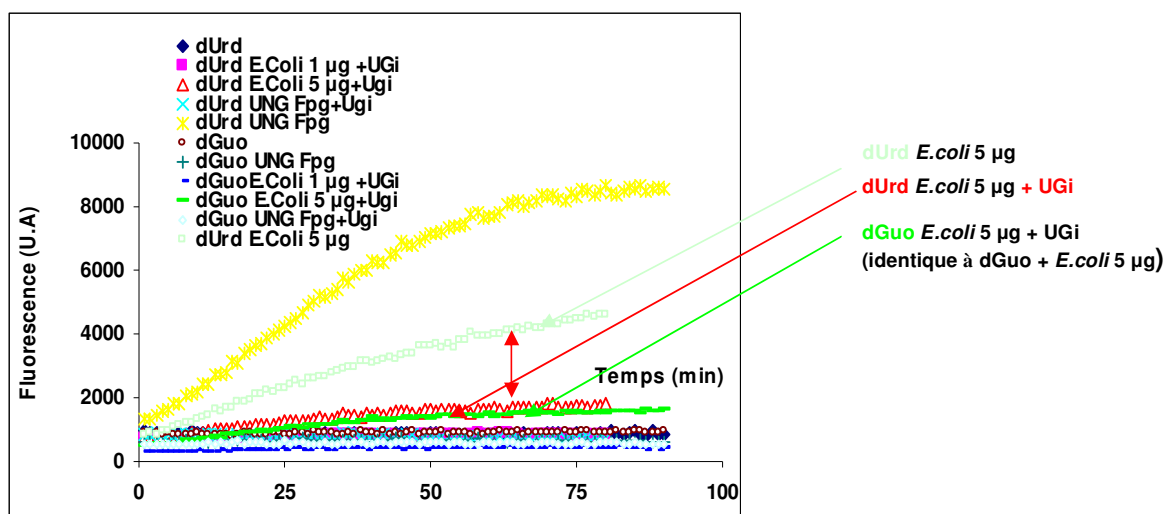
A. Effets de l'inhibition de l'UNG au sein d'extraits bactériens de *E.coli*

Une étude complémentaire de celle que nous avons mise en oeuvre pour étudier la spécificité de réparation de l'uracile par les extraits bactériens consiste en fait à bloquer spécifiquement la voie supposée de réparation, donc l'enzyme en charge de l'excision du dommage dans l'ADN : l'UNG bactérienne.

1. Analyse par Fluorescence

Pour ce faire, nous avons effectué à nouveau les expériences d'excision de l'uracile contenue dans la sonde dUrd Fluo, en présence de quantité croissantes d'extraits bactériens, ajoutant systématiquement une quantité fixe et en excès d'inhibiteur de l'UNG : l'UGi (4 μ M). Les résultats des expériences d'inhibition sont présentés dans la Figure 96.

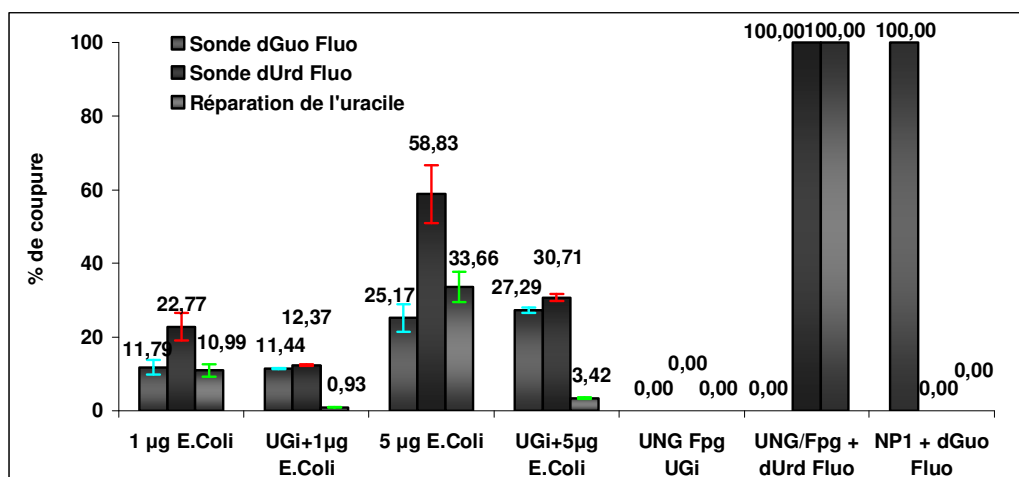
Figure 96: Effet d'inhibition de la réparation de l'uracile (contenue dans la sonde dUrd Fluo) par UGi pendant l'incubation en présence d'un extrait de *E.coli*



Cette figure représente les intensités de fluorescence obtenus pour les «hairpins» dGuo Fluo et dUrd Fluo chacun traité par 1 μ g ou 5 μ g d'extraits bactériens, avec ou sans adjonction d'UGi

dans le milieu réactionnel. Il apparaît clairement que: avec ou sans UGi, les valeurs de fluorescence de la sonde dGuo Fluo, traitée par les deux concentrations d'extraits de *E.coli* ne présente aucune différence. L'UGi n'affecte donc pas la faible dégradation non spécifique de «l'hairpin» dGuo Fluo par les nucléases. En revanche, le signal fluorescent de «l'hairpin» dUrd Fluo traité par 5 µg d'*E.coli* sans UGi (carrés vert pâle sur le graphe) est très différent de celui obtenu avec le même traitement en présence de l'inhibiteur (triangles rouges). On note en effet un effondrement du signal fluorescent en présence d'UGi, qui revient à la valeur du signal de «l'hairpin» dGuo Fluo (traité par 5 µg d'*E.coli* en présence d'UGi). La quantification du processus d'inhibition sélective par l'UGi de la réparation de l'uracile par un extrait d'*E.coli* est présentée dans la Figure 97.

Figure 97: Effets d'UGi sur les sondes dGuo Fluo et dUrd Fluo incubées en présence d'extrait de *E.coli* ; Implication sur la réparation de l'uracile



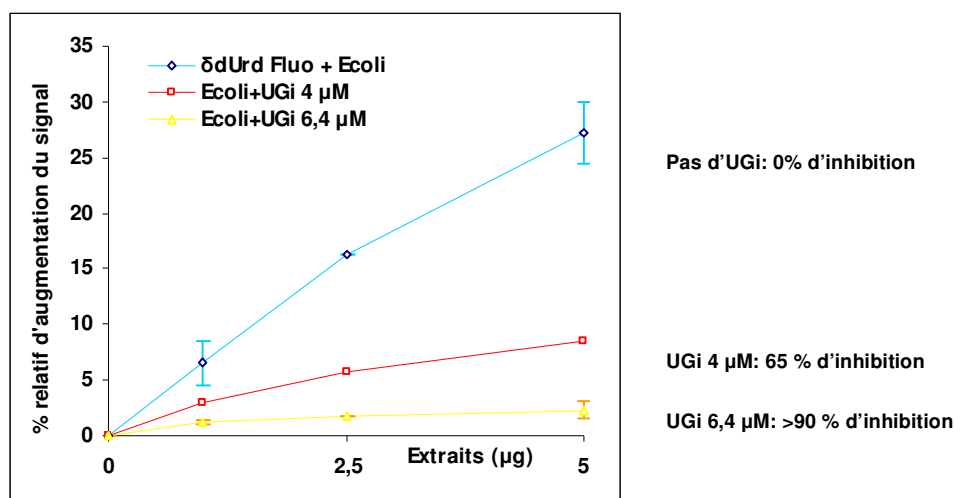
«L'hairpin» dGuo Fluo (colonnes bleues) traité par *E.coli* (quelque soit la dose) ne présente pas de différences de fluorescence en présence ou en absence d'UGi (en l'absence d'UGi: 11,79 % et 25,17 % d'augmentation de signal fluorescent à 1 µg d'extraits de *E.coli*; 11,44 % et 27,29 % avec UGi à 5 µg d'extraits). En revanche, «l'hairpin» dUrd Fluo (colonnes rouges) réagit différemment. On note que le traitement par 1 µg d'extraits de *E.coli* induit une réparation d'environ 10,99 % de l'uracile, totalement inhibée par l'ajout de UGi dans le mélange réactionnel (réparation de l'uracile réduite à 0,93 %). Le traitement de la sonde dUrd Fluo par les extraits de *E.coli* à 5 µg provoque une forte augmentation du signal fluorescent (58,83 % contre 22,77 % avec 1 µg d'extrait), correspondant à une réparation spécifique de l'uracile d'environ

33,66 %. Toutefois, l'addition d'UGi à 5 µg d'extraits d'*E.coli* inhibe quasi totalement le phénomène ; le signal fluorescent total revient à une valeur identique à celle de l'hairpin dGuo Fluo traité par la même dose d'extrait, avec ou sans UGi (30,71 % pour dUrd Fluo en présence d'UGi contre 27,29 % pour «l'hairpin» dGuo Fluo). L'augmentation résiduelle du signal fluorescent de réparation spécifique (3,4 %) est certainement dû aux voies de réparation alternatives impliquant les systèmes annexes des bactéries (comme la TDG, très active sur de l'Adn double-brin dans un milieu où l'uracile provient de la désamination spontanée de la cytosine et est appariée à un G (Jiricny *et al.*, 1988) ou encore les enzymes à activité d'excision de l'uracile de la famille des dsUNG (double strand UNG) (Gallinari & Jiricny, 1996), non inhibées par UGi). Malgré la variabilité inhérente aux expériences utilisant des extraits cellulaires, on peut conclure que l'inhibition est sélective de l'activité d'excision de l'uracile par l'UNG. Cette approche permet de valider notre système comme outil de détection d'activité spécifique de réparation et d'inhibition au sein d'extraits bactériens.

2. Effet dose réponse d' UGi sur la réparation de l'uracile par des extraits de *E.coli*

Nos sondes étant suffisamment sensibles pour permettre de quantifier des phénomènes d'inhibition de réparation dans des milieux complexes comme les extraits cellulaires, nous les avons utilisées pour optimiser la réaction d'inhibition par l'UGi. Des quantités croissantes de UGi ont été mises en présence des extraits de *E.coli* (1 µg, 2,5 µg et 5 µg) et des sondes «hairpins». Les variations de fluorescence ont été mesurées et reportées sous forme de graphe dans la Figure 98.

Figure 98: Effet inhibiteur dose réponse de l'UGi sur la réparation de l'uracile par un extrait de *E.coli*

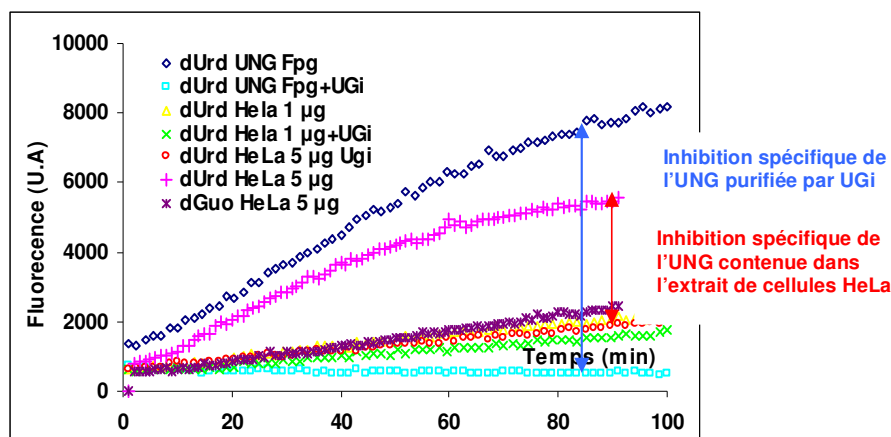


Cette figure présente le signal relatif à la réparation spécifique de l'uracile (δ dUrd Fluo) correspond à la différence des signaux obtenus pour «l'hairpin» dUrd Fluo et dGuo Fluo) en présence de quantités croissantes d'extraits de *E.coli* et d'inhibiteur de l'UNG. Comme nous l'avons précédemment observé, ce graphe met en évidence la quasi linéarité existant entre la quantité croissante d'extrait de *E.coli* utilisée et l'augmentation du signal de fluorescence du à la réparation de l'uracile. De plus, l'augmentation de la quantité d'UGi dans le milieu coïncide avec une extinction spécifique du signal fluorescent de la réparation de l'uracile.

B. Inhibition de l'UNG au sein d'extraits nucléaires de cellules HeLa

La même démarche expérimentale a été appliquée à l'étude de l'inhibition de la réparation de l'uracile par l'UGi, en présence d'extraits de cellules HeLa. On note à nouveau que, dans les mêmes conditions expérimentales (traitement par 1 µg ou 5 µg d'extraits de cellules HeLa, en présence ou non d'UGi), l'effet d'inhibition de l'UGi est remarquable. La Figure 99 montre les différents profils de fluorescence lors de la mise en présence des hairpins avec les extraits de cellules HeLa, avec UGi ou sans l'inhibiteur. La fluorescence est suivie en temps réel sur le lecteur microplaque Victor 3.

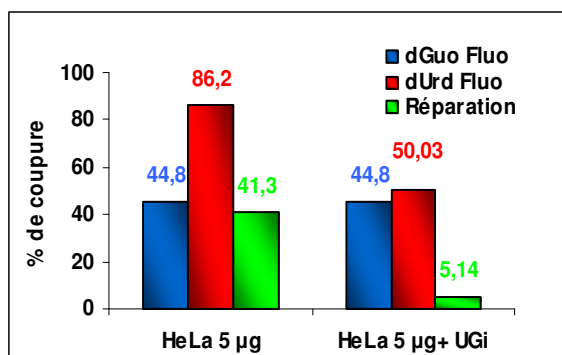
Figure 99: Influence d'UGi sur les cinétiques de dégradation-réparation de la sonde dUrd Fluo en présence d'extraits de cellules HeLa



Cette figure représente les cinétiques de dégradation/réparation de «l'hairpin» dUrd Fluo (100 nM) par des quantités croissantes d'extraits de cellules HeLa (respectivement 1 µg et 5 µg) en l'absence ou en présence d'UGi. La courbe de fluorescence de la sonde «hairpin» dGuo Fluo incubé avec 5 µg d'extraits de cellules HeLa est présentée et utilisée comme référence de la dégradation non spécifique dans ces conditions.

On note tout d'abord l'effet dose réponse liant la réponse fluorescente et la quantité d'extrait utilisée. En effet, une augmentation de la quantité d'extraits coïncide avec une augmentation du signal fluorescent. De plus, dès l'ajout de l'UGi au milieu réactionnel, on constate une diminution du signal fluorescent, plus marquée pour «l'hairpin» dUrd Fluo. En effet, l'incubation d'UGi (en excès, 4 µM) avec 5 µg d'extraits de cellules HeLa en présence de «l'hairpin» dUrd Fluo ramène la valeur de réparation de la lésion uracile à un niveau basal. Ce niveau correspond à un profil de fluorescence se superposant avec le profil de dégradation de «l'hairpin» dGuo Fluo non lésé, traité dans les mêmes conditions. Le signal obtenu pour «l'hairpin» dUrd Fluo en présence d'UGi correspond à une très faible réparation, et surtout à un signal de dégradation non spécifique. Cela signifie que seule la voie d'excision de l'uracile a été spécifiquement bloquée. La Figure 100 suivante illustre et quantifie la disparition du signal de réparation de l'uracile en présence d'UGi.

Figure 100: Effet d'inhibition de UGi sur la réparation de l'uracile contenue dans la sonde dUrd Fluo par un extrait de cellules HeLa



On rapporte dans les colonnes bleues le pourcentage d'augmentation du signal de «l'hairpin» dGuo Fluo, dans les rouges, celui de «l'hairpin» dUrd Fluo et dans les vertes, la réparation spécifique de l'uracile par l'extrait de cellules HeLa. On note ainsi la disparition du signal de réparation de l'uracile en présence de UGi : le signal de réparation spécifique passe de 41,3 % à 5,14%, dans nos conditions expérimentales (5 µg d'extraits de cellules Hela). Cette activité confirme la prise en charge de la lésion uracile de l'ADN préférentiellement par l'UNG. Malgré l'inhibition par UGi (spécifique de l'UNG), les autres systèmes de réparation que sont les sMUG ou MBD4, existants dans les extraits de cellules HeLa, contribuent aussi à la prise en charge de la lésion, avec une affinité toutefois moindre.

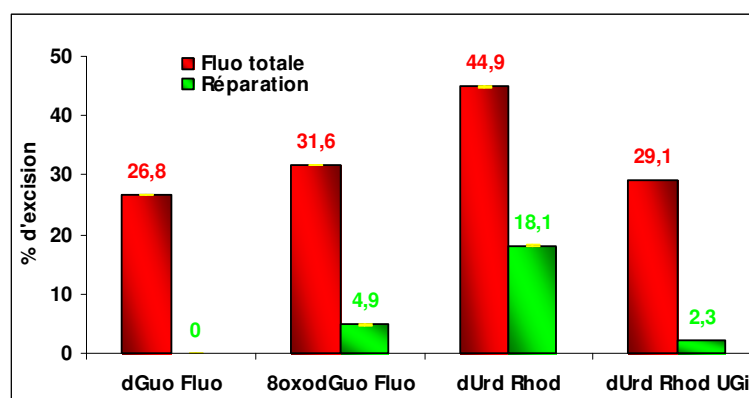
Ainsi, notre méthode Fluorescente s'avère totalement adaptée à la mise en évidence d'activité de réparation au sein d'extraits cellulaires, procaryotes ou eucaryotes, par simple suivi des variations du signal fluorescent engendrées par l'ajout de tel ou tel enzyme. De plus, nos sondes permettent le suivi d'activités inhibitrices spécifiques puisque UGi, en exerçant son activité inhibitrice de l'UNG, conduit à l'effondrement des signaux de fluorescence de réparation au niveau de ceux d'une dégradation non spécifique. Nos modèles sont donc suffisamment sensibles pour suivre ces variations d'activités d'une part (de façon stable et reproductible puisque le CV est compris entre 0,4 % et 2 %), et en milieux complexes d'autre part (les extraits nucléaires).

La dernière étape concernant l'utilisation des extraits cellulaires sur nos sondes « hairpins » a consisté à prouver leur efficacité pour la détection d'activités glycosylases sur un mélange contenant deux hairpins lésés (par deux lésions différentes) et marqués par deux chromophores différents.

IV. Suivi simultané par Fluorescence de plusieurs activités de réparation d'un mélange de sondes par des extraits de cellules HeLa

Parallèlement au développement des sondes pour l'accès aux constantes enzymatiques de glycosylases réagissant sur un mélange de sondes endommagées, nous proposons ici un travail similaire dans lequel l'activité des glycosylases d'un extrait nucléaire de cellules HeLa est étudiée. A ces fins, une sonde lésée contenant la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (marquée par la fluorescéine : sonde 8-oxodGuo Fluo) et une sonde contenant l'uracile (marquée par la rhodamine : sonde dUrd Rhod), sont mises en mélange (100 nM) et incubées conjointement avec 2 µg d'extrait de cellules HeLa, dans le même milieu réactionnel. Les variations de fluorescence des deux sondes en mélange sont suivies parallèlement aux longueurs d'émission spécifiques de chacune des deux «hairpins» : 525 nm pour la sonde 8-oxodGuo Fluo et 580 nm pour la sonde dUrd Rhod, à l'aide d'un spectrofluorimètre LS 50B. La sonde non lésée dGuo Fluo a été utilisée comme témoin de dégradation non spécifique et incubée dans les mêmes conditions que les deux autres sondes spécifiques. Nous avons également étudié l'influence de l'inhibiteur UGi dans ces mêmes conditions. Les résultats de ces expériences sont rapportés dans la Figure 101.

Figure 101: Détection et quantification des signaux de fluorescence pour le mélange «d'hairpins» 8-oxodGuo Fluo et dUrd Rhod incubées avec un extrait de cellules HeLa (2 µg) à 37°C, en absence ou en présence d'UGi. Détection à l'aide du spectrofluorimètre LS 50B, Perkin Elmer



L'analyse des résultats obtenus par cette série d'expériences apporte les informations suivantes : dans nos conditions expérimentales, la dégradation non spécifique de «l'hairpin» dGuo Fluo imputable à l'activité des nucléases contenues dans l'extrait s'élève à 26,8 %. De ce fait, la

différence entre la fluorescence totale du mélange obtenue pour chacune des deux longueurs d'ondes d'intérêt et cette valeur, permet d'accéder au taux d'excision (donc de réparation par les glycosylases) des lésions contenues dans les sondes lésées. Ainsi, on relève une activité de réparation de la lésion 8-oxo-7,8-dihydroguanine de 4,9 % par l'extrait de cellules Hela de même qu'une activité de réparation de l'uracile par ce même extrait de 18 %. Ces valeurs sont comparables à celles précédemment trouvées lors de l'incubation séparée des sondes avec les extraits de cellules HeLa à 1 µg. En effet, un traitement par 1 µg d'extrait de la sonde «hairpin» 8-oxodGuo Fluo conduisait à un taux de réparation estimé à environ 10 %, et l'uracile contenue dans la sonde dUrd Fluo était excisée à environ 20 % (cf. Figure 90). Compte tenu de l'ensemble des valeurs trouvées et de leur ordre de grandeur, on peut conclure sur la capacité de notre méthode et de nos sondes à évaluer les activités de réparation par excision de bases oxydées présentes dans un même extrait cellulaire. Même si l'aspect quantitatif est à optimiser (l'expérience avec les sondes contenues dans le même mélange n'a été effectuée qu'une seule fois), ces résultats prouvent la versatilité de notre méthode, ainsi que l'éventail d'applications envisageables. On pourra ainsi envisager la comparaison d'activités glycosylases contenues dans des extraits cellulaires d'origines diverses (comparaison de lignées cellulaires déficientes ou surexprimant une enzyme/voie de réparation spécifique en recherche fondamentale ; comparaison d'extraits issus d'échantillons biologiques prélevés sur volontaires ou sur patients en recherche clinique..), si toutefois la détection est calibrée (importance d'un témoin de dégradation non spécifique due à l'activité des nucléases) et si le signal étudié est unique (à une activité enzymatique ne doit correspondre qu'un seul signal fluorescent). Ici encore, l'importance de la conception des sondes et des groupements chromophores à adjoindre prend toute son envergure pour la validation de notre méthode.

Bibliographie

- Arkin, M.R., Stemp, E.D., Pulver, S.C., & Barton, J.K. (1997) Long-range oxidation of guanine by Ru(III) in duplex DNA. *Chem Biol*, **4**, 389-400.
- D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D., & Cadet, J. (1999) Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by Escherichia coli endonuclease III and Fpg proteins: kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry*, **38**, 3335-44.
- Gallinari, P. & Jiricny, J. (1996) A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase. *Nature*, **383**, 735-8.
- Hall, D.B., Holmlin, R.E., & Barton, J.K. (1996) Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature*, **382**, 731-5.
- Jiricny, J., Hughes, M., Corman, N., & Rudkin, B.B. (1988) A human 200-kDa protein binds selectively to DNA fragments containing G.T mismatches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8860-4.
- Packard, B.Z., Toptygin, D.D., Komoriya, A., & Brand, L. (1996) Profluorescent protease substrates: intramolecular dimers described by the exciton model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11640-5.
- Purmal, A.A., Lampman, G.W., Bond, J.P., Hatahet, Z., & Wallace, S.S. (1998) Enzymatic processing of uracil glycol, a major oxidative product of DNA cytosine. *J Biol Chem*, **273**, 10026-35.

Cinquième partie

Réparation enzymatique en nano-volumes : Application des sondes fluorescentes en solution sur micropuce

Cinquième partie

Réparation enzymatique en nano-volumes : Application des sondes fluorescentes en solution sur micropuce

I.	Le support : présentation de la puce EWOD (electrowetting on dielectric microprocessor)	171
A.	Description	171
B.	Dispositif expérimental pour l'analyse par les sondes fluorescentes	173
II.	Application : La puce EWOD pour l'analyse de sondes nucléiques fluorescentes appliquées à la mesure de réparation enzymatique de l'ADN.....	174
A.	Dégradation non spécifique par la Nucléase P1 : suivi par fluorescence sur puce EWOD	174
B.	Application de la puce EWOD à la détection d'activité de réparation enzymatique sur le couple Fpg/8-oxodGuo Fluo	175
III.	Analyses des cinétiques enzymatiques en nano-gouttes sur support EWOD.....	177
A.	Effet dose-réponse	177
B.	Accès aux paramètres cinétiques	179
IV.	Test d'inhibition de l'activité de l'UNG par l'UGi	180

Réparation enzymatique en nano-volumes : Application des sondes fluorescentes en solution sur micropuce

Nous avons précédemment démontré la faisabilité technique et l'aptitude des sondes fluorescentes à servir de balises moléculaires pour la détection et la quantification d'activités enzymatiques de réparation de l'ADN en tubes et en format microplaque. Il a de même été montré l'aptitude de ces sondes à donner accès aux paramètres enzymatiques, ainsi que leur intérêt si on envisage leur utilisation en tant qu'outil de « screening » à haut débit d'inhibiteurs enzymatiques. Dans un but d'application clinique de notre projet, nous avons cherché à nous placer dans le cadre des contraintes imposées par un prélèvement biologique : petit volume d'échantillon, analyse parallèle de plusieurs facteurs sur ce même échantillon et automatisation des analyses. Parallèlement à nos expérimentations, un support électronique a été conçu et développé, dans un but ultime de miniaturisation extrême des systèmes d'analyses simultanées dans un format « lab-on-a-chip ».

I. Le support : présentation de la puce EWOD (electrowetting on dielectric microprocessor)

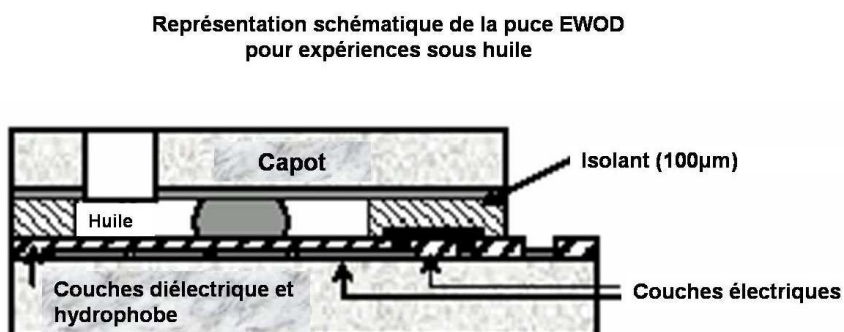
Initialement développé pour des applications de PCR quantitative (Fouillet *et al.*, 2005), nous proposons de transposer l'utilisation de cette puce à l'analyse d'activité de réparation de l'ADN en format miniaturisé. Ce système de technologie microfluidique intègre plusieurs fonctions : délivrance de liquide, déplacement ou encore mélange de deux solutions différentes.

A. Description

Ce support est schématiquement composé d'une matrice remplie d'électrodes, sur laquelle repose une couche d'isolant électrique, elle-même recouverte d'une couche hydrophobe. La création d'un nombre croissant de charges électriques en surface de cette couche hydrophobe génère des variations dans les propriétés de mouillabilité de surface. En jouant sur ces différences de mouillabilité, on peut par exemple entraîner un déplacement de liquide à la surface de cette micro puce. La Figure 102 montre l'organisation de ce support, en intégrant un

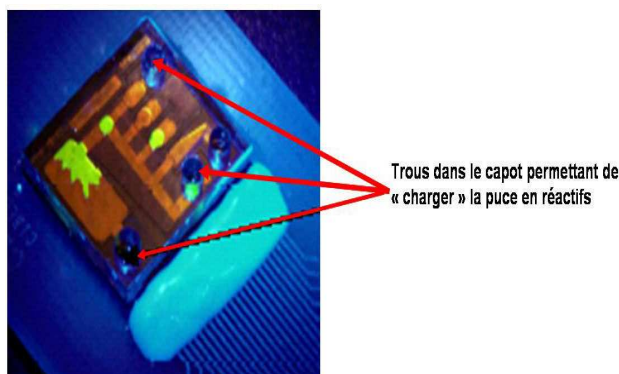
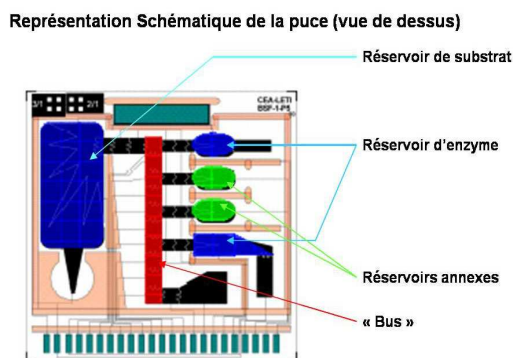
couvercle ou capot, permettant des analyses sous huile et la réduction de l'évaporation, en cas de chauffage.

Figure 102: Vue schématique de profil de la puce



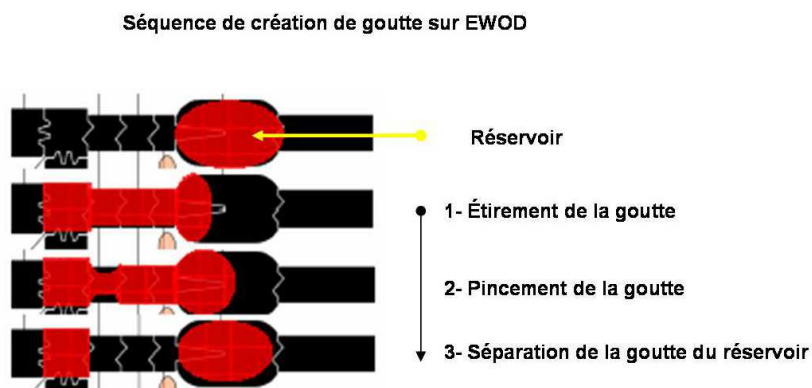
Cette puce contient un réservoir important en forme d'étoile pour le stockage et la délivrance du substrat à analyser (colorée en bleu sur la figure 2 ; par exemple, nos sondes fluorescentes) ; elle contient également deux réservoirs secondaires destinés à contenir et délivrer l'enzyme (soit purifiée, soit contenue dans un extrait cellulaire, un échantillon sanguin etc....en bleu sur la Figure 103) ; deux réservoirs intermédiaires sont encore à disposition pour conserver d'éventuels produits secondaires de réaction (un tampon enzymatique, un produit de dégradation...en vert sur la Figure 103) ; et enfin un « bus » (Figure 103, partie rouge linéaire) permet le déplacement et l'homogénéisation des gouttes contenant les réactifs, lors de leur coalescence. La Figure 104 montre une photo de cette puce avec les réservoirs remplis de solution fluorescente (fluorescéine).

Figure 103: Représentation schématique de la puce (vue de dessus) Figure 104: Illustration avec une solution de FITC



La délivrance des gouttes se fait par un jeu de séquences d'activation et inactivation d'électrodes, permettant, par la création de différence de tension de surface sur la puce afin d'étirer la goutte contenant l'échantillon, pour la séparer du liquide contenu dans le réservoir (Figure 105).

Figure 105 : création d'une goutte sur la puce EWOD

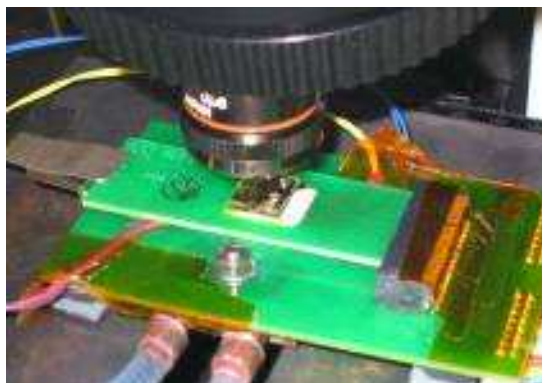


La reproductibilité de création de goutte (volumes générés : 64 nl par goutte) ainsi que les coefficients de variations associés ont été évalués (CV=3%).

B. Dispositif expérimental pour l'analyse par les sondes fluorescentes

Les composants électriques de la puce sont contrôlés par un logiciel spécifique contrôlant la séquence permettant l'activation sélective d'électrodes, autorisant le déplacement des réactifs en solution. Cette puce repose sur un thermorégulateur permettant la calibration thermique du système et l'ensemble est disposé sur une plate-forme de microscope à fluorescence pour enregistrer les valeurs de fluorescence du FLUO-dT (excitation 492 nm, émission 520 nm) ; la Figure 106 montre une photo du dispositif expérimental.

Figure 106: Dispositif expérimental : Plate-forme de microscopie de fluorescence utilisée pour la puce EWOD



Ainsi prévue pour des expérimentations avec détection par fluorescence, nous avons testé les sondes sur ce support afin de corroborer les résultats trouvés jusqu'alors en format tube et microplaque pour les confronter à ceux obtenus avec la puce EWOD. De cette façon nous voulons montrer la capacité de la puce EWOD à effectuer des analyses automatisées, parallélisées, miniaturisées et fiables sur nos substrats fluorescents.

II. Application : La puce EWOD pour l'analyse de sondes nucléiques fluorescentes appliquées à la mesure de réparation enzymatique de l'ADN.

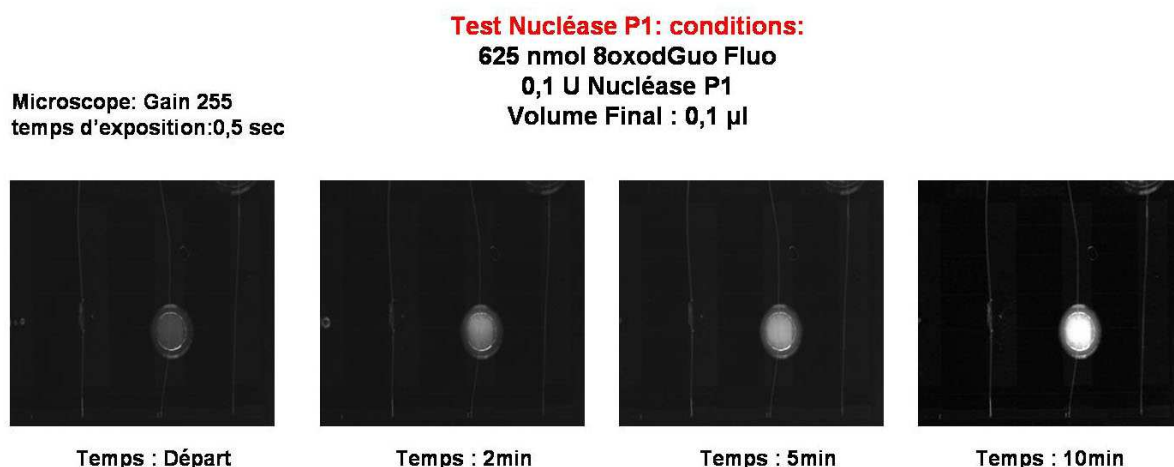
L'analyse sur puce EWOD nécessite des volumes de réactifs plus faibles ($< 1 \mu\text{l}$) que pour des mesures sur micro plaque. Ainsi, les solutions « d'hairpins » sont utilisées à la même concentration de 100 nM mais dans un volume final de 128 nl sur la puce. Pour les autres analyses, la concentration « d'hairpin » n'étant pas un facteur limitant, nous avons effectué ces mesures avec des concentrations croissantes de sondes.

A. Dégradation non spécifique par la Nucléase P1 : suivi par fluorescence sur puce EWOD

Comme précédemment décrit, les premières expériences ont porté sur la calibration du système de détection en utilisant la dégradation non spécifique des « hairpins » par la Nucléase P1 (fixation du 100% de fluorescence).

L'expérience consiste à dispenser 2 gouttes de 64 nl de substrat et d'enzymes (goutte positive), ou de substrat et de tampon (goutte contrôle), et de les mélanger sur la puce. Lors de la mise en présence de l'enzyme et de son substrat, la réaction enzymatique est initiée et la fluorescence est mesurée en direct. La Figure 107 montre l'évolution de la réaction pour différents temps d'incubation.

Figure 107: Test d'activité à la Nucléase P1 sur puce EWOD : Photographies prises lors de la réaction à différents temps d'incubation en présence de l'enzyme.



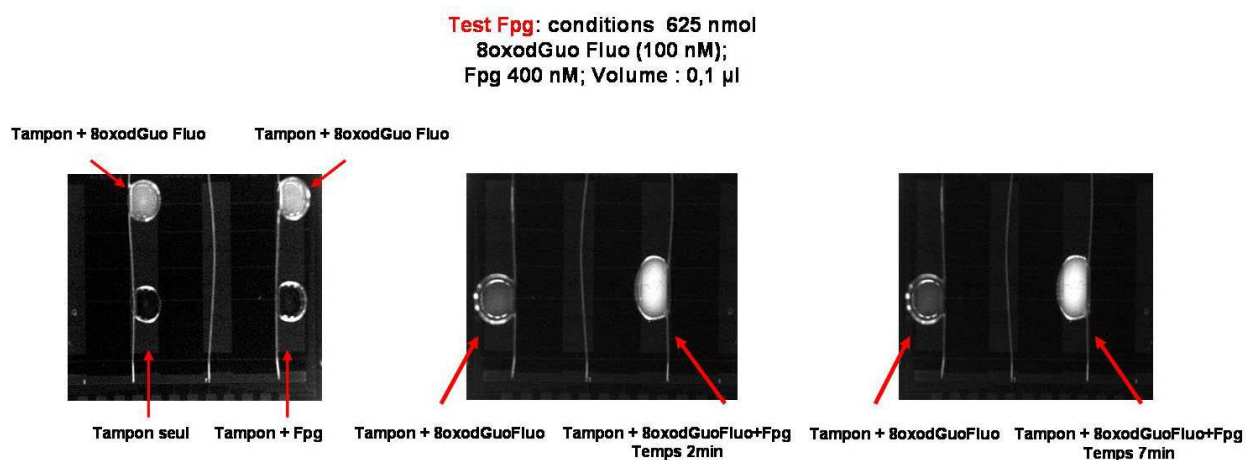
Au départ (juste après la coalescence de la goutte contenant «l'hairpin» substrat et celle renfermant l'enzyme), la fluorescence est faible, correspondant au « bruit de fond » issu du « quenching » non total de «l'hairpin». On constate une nette augmentation du signal lumineux avec le temps. L'intensité de fluorescence mesurée après 10 minutes n'évolue presque plus avec le temps. Elle atteint le signal maximal attendu pour la dégradation totale de «l'hairpin» 8-oxodGuo Fluo par la Nucléase P1. L'obtention de ce résultat probant en terme de détection et de quantification a conduit à tester «l'hairpin» 8-oxodGuo Fluo en réaction avec la glycosylase spécifique de la lésion, la protéine Fpg.

B. Application de la puce EWOD à la détection d'activité de réparation enzymatique sur le couple Fpg/8-oxodGuo Fluo

La même démarche expérimentale est utilisée : 2 gouttes d'un volume de 64 nl, créées par électromouillage, sont mises en contact, l'une contenant la protéine Fpg (400 nM) et l'autre le substrat «hairpin» 8-oxodGuo Fluo (100 nM). Parallèlement, une goutte de 64 nl de tampon

enzymatique, dépourvue d'enzyme est mise en contact avec une goutte de volume équivalent contenant le substrat (la goutte contrôle). L'expérience est thermostatée à 37°C. L'évolution de la réaction enzymatique est suivie par fluorescence en fonction du temps. Les photos présentées dans la Figure 108 résument les résultats de l'expérience.

Figure 108: Test d'activité à la Fpg sur puce EWOD

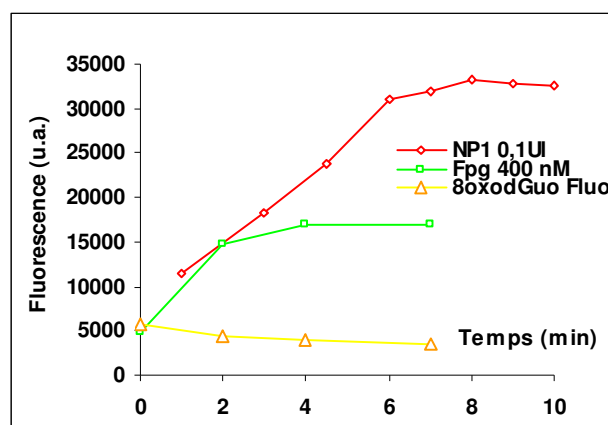


On note la présence d'une fluorescence résiduelle dans les gouttes correspondant à la sonde seule. Ceci confirme visuellement le taux de «quenching» par le DABCYL, évalué à 80%. Une fois la réaction enzymatique amorcée par la coalescence des réactifs, la variation de fluorescence est suivie dans le temps. On note que la fluorescence atteint un plateau à 7 minutes. L'augmentation du signal fluorescent entre le temps initial et 7 minutes confirme que «l'hairpin» est efficacement reconnue par l'enzyme et que le signal généré est directement relié à l'activité enzymatique de Fpg.

La puce EWOD, dans les conditions expérimentales déterminées, apparaît être adaptée à une utilisation comme support d'étude d'interactions moléculaires, dans le cas présent l'enzyme et son substrat.

La Figure 109 présentée ci dessous illustre les différences d'activités enzymatiques mesurées sur la puce EWOD (comparables à celles mesurées par analyse sur lecteur microplaque) entre la Nucléase P1 et la Fpg.

Figure 109: Activités enzymatiques de Fpg et de la Nucléase P1 détectées sur la puce EWOD



L'augmentation du signal de fluorescence correspondant à l'excision de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine par la Fpg est inférieure (facteur = 3,5) à celle enregistrée pour la dégradation par la Nucléase P1 (facteur = 6,5). La sonde « hairpin » dGuo Fluo non lésée utilisée comme témoin négatif confirme l'absence de variation de signal lors d'une incubation par Fpg (résultats non présentés, effectués en parallèle à chaque expérimentation). Ces résultats confirment la spécificité de la glycosylase sur son substrat ainsi que la spécificité de détection du système

III. Analyses des cinétiques enzymatiques en nanogouttes sur support EWOD

Une fois les conditions expérimentales validées, nous avons étudié les caractéristiques cinétiques de la protéine Fpg vis-à-vis du substrat « hairpin » 8-oxodGuo Fluo, par détection avec la puce EWOD pour les comparer aux valeurs obtenues par détection en format microplaque.

Afin de faciliter la comparaison, l'étude cinétique a été effectuée en parallèle sur la puce EWOD mais aussi en tubes (analysés par le lecteur PCR « Stratagène »).

A. Effet dose-réponse

Les relations dose-réponse entre enzyme et substrat ont été établies sur les deux types de détecteur. Une solution de protéine Fpg (1 μ M) a tout d'abord été incubée en présence « d'hairpin » 8-oxodGuo Fluo à plusieurs concentrations. Les résultats rapportés dans les Figure

110 et Figure 111 montrent une parfaite concordance des réponses fluorescentes quelque soit le détecteur utilisé.

Figure 110: Détection de fluorescence sur puce EWOD

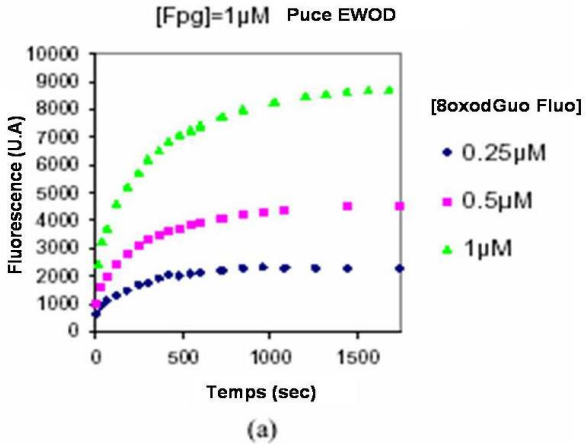
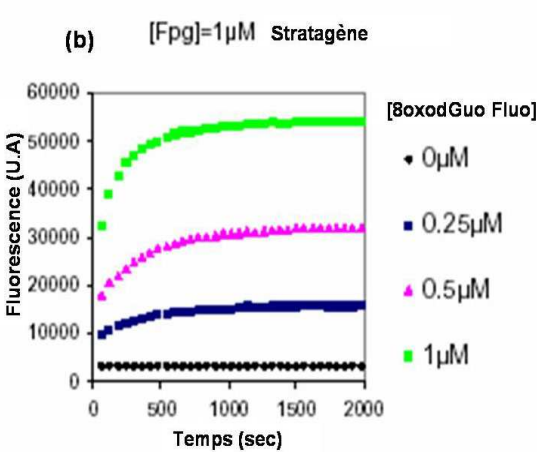


Figure 111: Détection fluorescente sur Stratagène



Dans les deux cas de figure, la valeur du plateau de fluorescence augmente avec la concentration «d’hairpin» à traiter, pour une quantité d’enzyme donnée.

Dans un second temps, une quantité fixe de substrat 8-oxodGuo Fluo (1,2 µM) est mise en présence de concentrations croissantes de Fpg. Le but est ici de définir la quantité minimale d’enzyme permettant un seuil de détection significatif. Les résultats de ces expériences sont présentés dans les Figure 112 et Figure 113.

Figure 112: Détection minimale de Fluorescence sur EWOD

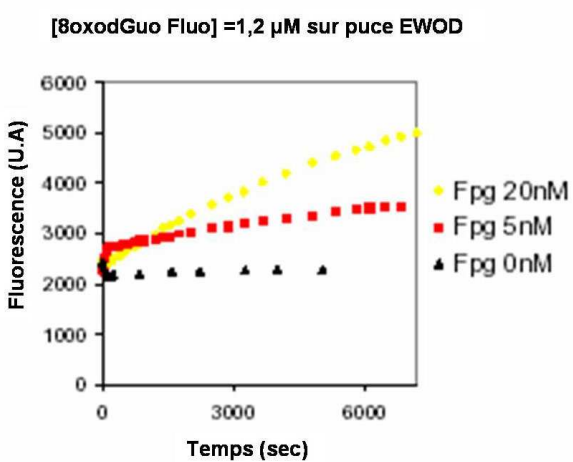
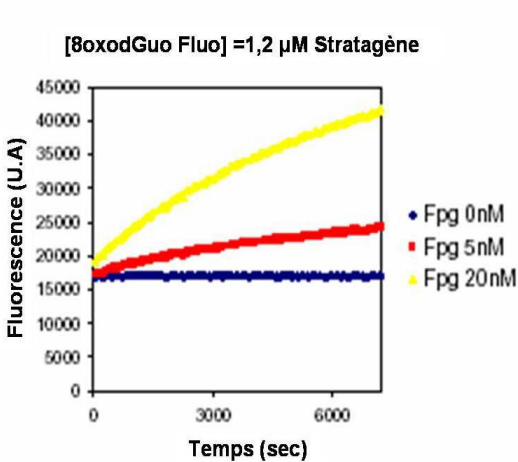


Figure 113: Détection sur Stratagène

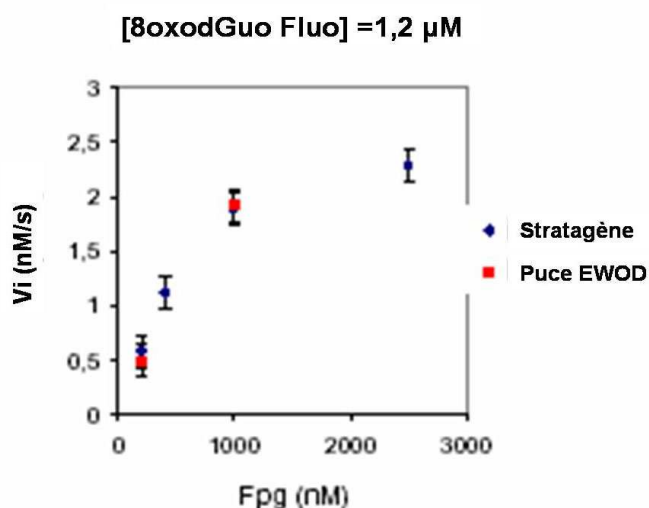


A nouveau, les résultats obtenus avec ces deux détecteurs concordent et montrent un signal de fluorescence qui augmente avec la quantité de Fpg présente dans le mélange. Un seuil de 5 nM de Fpg est la limite inférieure détectée pour laquelle l'analyse est possible. En dessous de ce seuil, la détection de fluorescence dans les toutes premières secondes devient difficile, rendant impossible la détermination des constantes cinétiques (vitesse initiale) de la Fpg dans la réaction enzymatique. On pourra remarquer que les échelles arbitraires dans les deux détecteurs n'affichent pas les mêmes valeurs de fluorescence. Toutefois, si on exprime le rapport d'augmentation de fluorescence dans les deux conditions, la présence de 5 nM de la protéine Fpg induit une augmentation d'un facteur 1,5 alors qu'un ajout de 20 nM de Fpg se traduit par un triplement de l'intensité de fluorescence sur puce comme lors de la détection par le lecteur Stratagène.

B. Accès aux paramètres cinétiques

L'exploitation des données obtenues au cours des analyses précédentes montre un excellent accord entre les résultats obtenus par détection sur la puce EWOD ou avec le lecteur Stratagène. La Figure 114 suivante montre une représentation graphique des vitesses initiales de l'enzyme Fpg en fonction de la concentration en substrat 8-oxodGuo Fluo avec les deux systèmes de lecture.

Figure 114: Courbe $V_i=f(S)$ présentant la corrélation des résultats obtenus sur la puce EWOD et le lecteur Stratagène pour la détection de la vitesse initiale d'excision de la 8-oxoGua par la protéine Fpg



Les deux courbes se superposent parfaitement, et semblent obéir à une cinétique michaelienne. Ainsi les paramètres enzymatiques obtenus à partir des mesures effectuées sur les deux types de

détecteur semblent similaires, démontrant l'adaptation de la puce EWOD à l'étude des cinétiques enzymatiques par analyse de fluorescence.

En utilisant la même démarche analytique précédemment mise en œuvre pour l'analyse des constantes enzymatiques par fluorescence en format microplaque, nous avons déterminé les différents paramètres caractéristiques de la Fpg pour la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, évalués cette fois par la puce EWOD. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant (Figure 115).

Figure 115: Tableau récapitulatif des paramètres enzymatiques

<i>Enzyme</i>	<i>Substrat et détecteur</i>	<i>K_m (μM)</i>	<i>K_{cat} (μM substrat/s⁻¹)</i>	<i>K_{cat}/K_m (10⁻³)</i>
Fpg	8-oxodGuo Fluo/Stratagène	1,99	9,5 10 ⁻³	5
Fpg	8-oxodGuo Fluo/puce EWOD	0,125	4,2 10 ⁻³	33

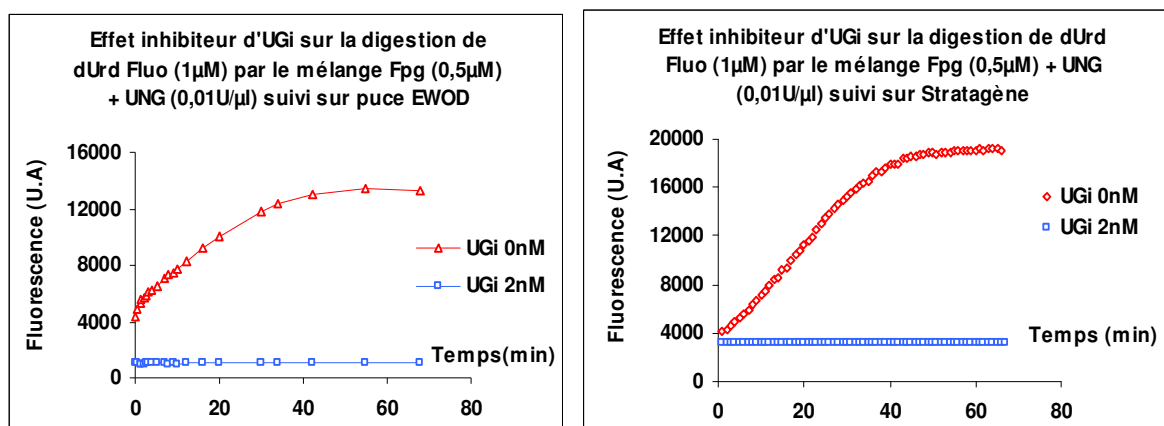
Les valeurs obtenues par détection sur format supporté (puce biosoc EWOD) ou par détection en solution homogène (Stratagène) sont comparables entre elles, malgré la présence d'un facteur 6 entre les valeurs du rapport K_{cat}/K_m . En effet, les données sont insuffisantes pour affirmer à la similarité de quantification de la méthode sur puce EWOD et par Stratagène ; toutefois les ordres de grandeur sont comparables. Ces différences sont probablement dues à plusieurs paramètres dont le nombre insuffisant d'expériences sur EWOD (accès restreint au banc de manipulation), ainsi qu'aux très faibles volumes utilisés (précision de pipetage). Compte tenu de l'erreur forcément commise lors d'approximation de lecture ou de calculs, ces résultats sont toutefois encourageants. Ils confèrent toute sa légitimité à la puce EWOD pour la détection et la mesure d'activité de réparation enzymatique en nano volume, valorisant par la même le support et les applications de «screening» parallélisé qui sont envisagées.

IV. Test d'inhibition de l'activité de l'UNG par l'UGi

De la même façon que nous avons évalué des activités enzymatiques inhibitrices par fluorescence en format microplaque, l'étude a été effectuée sur puce dans les mêmes conditions expérimentales que celles établies pour l'étude de cinétique enzymatique (température contrôlée, tampon similaires, etc...).

Ainsi «l'hairpin» dUrd Fluo a d'abord été incubée avec un mélange d'UNG et de Fpg. Parallèlement, le même mélange «hairpin»/UNG/Fpg a été mis en présence d'UGi, inhibiteur de l'UNG. Le suivi de fluorescence a été effectué sur puce EWOD (Figure 116) et sur lecteur Stratagène (Figure 117).

Figure 116: Effet inhibiteur d'UGi suivi sur EWOD Figure 117: Effet inhibiteur d'UGi suivi sur Stratagène



Ici encore, les résultats présentés sous forme de courbes cinétiques sur les figures 15 et 16 confirment :

- Une action concertée et ordonnée des enzymes avec le substrat dUrd Fluo : la fluorescence augmente de façon significative en présence de l'activité glycosylase de l'UNG et de l'activité lyase de la Fpg. En revanche, le signal est sélectivement éteint par une forte concentration d'UGi (2 nM), suggérant l'inhibition spécifique de la création du site abasique par l'UNG.
- La similarité des réponses entre la puce EWOD et le lecteur en phase homogène Stratagène.

Pour conclure, cette étude, à priori destinée à valoriser le support conçu, s'est révélée concluante. La puce, sous réserve de certaines améliorations, peut servir d'outil de mesure d'activités de réparation enzymatique ou de format pour la recherche parallélisée d'activité inhibitrice, et cela avec de faibles volumes d'analyse. Son utilisation en recherche clinique pourrait en faire un atout de choix, compte tenu des volumes de réactifs nécessaires et de la très bonne sensibilité et reproductibilité du système (possibilité d'analyse en phase homogène d'activités de réparation présentes au sein d'extraits cellulaires).

Bibliographie

Fouillet, Y., Jary, D., Brachet, A.G., Chabrol, C., Boutet, J., Clementz, P., Lauro, D., Charles, R., & Peponnet, C. (2005) EWOD Digital microfluidics for Lab On a Chip. *Proceeding MicroTAS*.

Sixième Partie
Discussion / Conclusion

Sixième Partie

Discussion / Conclusion

I.	Discussion	187
A.	Conception, synthèse et caractérisation des sondes substrats.....	187
B.	Analyse par fluorescence:application de notre méthode	190
C.	Fluorescence et analyse de paramètres enzymatiques.....	192
1.	Détermination des caractéristiques enzymatiques	192
2.	Etude de l'inhibition enzymatique	194
D.	Etudes d'activités de réparation par BER à partir d'extraits cellulaires.....	194
E.	Miniaturisation du système d'analyse en format « lab-on-a-chip » (puce EWOD).....	197
II.	Conclusion	200

I. Discussion

Les différentes altérations des acides nucléiques, induites par des processus chimiques, biochimiques ou physico-chimiques, sont habituellement prises en charge par des enzymes de réparation, capables de détecter de façon spécifique ou non les dommages engendrés. Or, une perturbation des systèmes de réparation résulte généralement dans l'apparition de pathologies comme certains cancers, différents syndromes de sensibilité accrue aux UV (xeroderma pigmentosum, syndrome de Cockayne...); leur implication dans les phénomènes de vieillissement ou de mutagenèse est aujourd'hui reconnue. Il est donc essentiel que les acteurs de la réparation cellulaire soient hautement fonctionnels. La première étape de la réparation consiste à reconnaître et exciser la lésion. Les enzymes impliquées peuvent être caractérisées par leur activité et leur spécificité que l'on peut relier à leurs constantes de vitesse (V_{ini} , V_{max}) et d'affinité (K_m) pour la lésion qu'elles réparent.

Les méthodes traditionnelles d'études de systèmes de réparation enzymatique de l'ADN et d'évaluation des constantes cinétiques des enzymes font appel essentiellement au marquage radioactif de substrats cibles modifiés puis à l'analyse des mélanges réactionnels par électrophorèse sur gel ou chromatographie liquide haute performance. Ces méthodes, bien que hautement résolutes, ont l'inconvénient de ne pas donner de résultats en temps réel. Leur mise en œuvre est lourde, fastidieuse et non applicable en analyse biomédicale de routine.

Le travail rapporté ici est une étude comparative entre la méthode par radiomarquage / électrophorèse sur gel et une nouvelle méthode spectrofluorimétrique, plus élégante, basée sur le principe du FRET, pour l'évaluation des capacités de réparation enzymatique des dommages oxydatifs de l'ADN par les ADN-*N*-glycosylases. Les avantages de cette approche résident dans la rapidité d'obtention de résultats quantifiables, dans un suivi en temps réel au cours de l'expérience et enfin dans l'éventuelle automatisation des analyses.

A. Conception, synthèse et caractérisation des sondes substrats

La stratégie utilisée a essentiellement impliqué l'utilisation du principe de FRET sur un substrat oligonucléotidique, synthétique, modifié par incorporation d'une lésion spécifique, pour le suivi des cinétiques de réparation de l'ADN par BER. Même si les études de cinétique d'enzymes de restriction, faisant appel à des substrats doublement marqués par des groupements chromophores et basées sur le FRET, ont déjà démontré l'utilité et la validité du système (Li et al., 2000; Sixou et al., 1994), aucune n'avait au démarrage de ce projet, abordé l'analyse de paramètres

enzymatiques de réparation de l'ADN en utilisant un substrat simple brin, de type "hairpin", marqué par deux groupements chromophores. Ce substrat tient le rôle de balise moléculaire. Il est modifié (insertion d'une base endommagée et de groupements chromophores) pour être le substrat de l'enzyme étudiée et rapporter l'activité enzymatique grâce à l'analyse par fluorescence.

A partir des expériences effectuées à ce jour et exposées dans ce travail, nous pouvons faire ressortir quelques points essentiels :

La purification et l'obtention d'oligonucléotides synthétiques constituent une étape décisive dans le processus d'analyse. Une mauvaise purification des sondes est susceptible d'affecter la détection de fluorescence en diminuant significativement le rapport signal/bruit. De plus, la présence de structures "hairpin" tronquées (arrêts de synthèse n-1, n-x nucléosides...) peut entraîner l'apparition de duplex/triplex, contaminant et ainsi perturber la reconnaissance des lésions par les enzymes de réparation ou même fausser le résultat de l'expérience. Les analyses par spectrométrie de masse nous ont conduit à effectuer plusieurs cycles de purification de nos substrats « hairpins ». En effet, ces oligonucléotides de longueur importante (34 mers) possèdent une structure originale (structure en « hairpin », insertion de synthons modifiés, ajout de fluorochromes). Toutes ces modifications et la longueur des substrats ont rendu l'analyse de ces produits délicate ; la présence de sels dans les tampons d'analyse peuvent biaiser l'expression des résultats obtenus (décalage de masses, rapport signal sur bruit trop faible...). Seule une analyse poussée par spectrométrie de masse faisant suite à une purification minutieuse par CLHP a pu garantir l'intégrité et la pureté du produit attendu.

La validation de ce nouveau modèle a nécessité plusieurs étapes. Notre démarche a d'abord été d'établir l'existence d'une corrélation linéaire entre le signal fluorescent détecté et la concentration en substrat marqué par un fluorochrome en solution. Plusieurs substrats ont été investigués avec une structure simple (oligonucléotide linéaire marqué par un groupement fluorescent) ou "hairpin" - lésée ou non -, doublement marquée. Chaque substrat utilisé a été caractérisé par spectrofluorimétrie (T_m , spectres d'excitation et d'absorption, relation de linéarité entre fluorescence et signal obtenu, efficacité de "quenching"...) et par analyse concomitante sur gel d'acrylamide, afin de valider les résultats obtenus par fluorescence. L'applicabilité du suivi par fluorescence pour la détection d'activité enzymatique a ensuite été déterminée. Pour cela, chaque substrat a été digéré par des nucléases non spécifiques et l'évolution du signal fluorescent a été suivie dans le temps. Les variations des signaux

fluorescents) correspondants à l'addition des enzymes ont confirmé la validité de notre approche. Afin d'évaluer la spécificité des enzymes de réparation étudiées, l'analyse a porté à la fois sur des substrats linéaires double brin modifiés (les duplexes dGuoFluo/dCyt Dabcyl et 8-oxodGuo Fluo /dCyt Dabcyl) et sur les substrats de type "hairpin". On peut noter que les analyses effectuées ont confirmé la reproductibilité des expériences ainsi que la validité de la méthode par transfert de fluorescence pour la détection et la quantification de l'activité des enzymes de réparation de l'ADN de type glycosylase.

Comme il a été décrit dans la partie analyse et caractérisation des substrats, le modèle "hairpin" permet de s'affranchir de nombreuses difficultés et limitations, susceptibles de fausser l'analyse, par comparaison avec un substrat synthétique double brin :

Le double marquage de la sonde "hairpin", par un quencher et un fluorophore, assure une stœchiométrie 1 : 1 pour les groupements chromophores : 1 dabcyl « quenche » une seule fluorescéine ou une seule rhodamine. Il n'existe donc pas de quencher ou de fluorochrome libre et en excès dans le milieu. De ce fait, il est possible de déterminer l'efficacité de "quenching" due au chromophore dabcyl et ainsi d'évaluer la fluorescence résiduelle de l'échantillon. Dans cette étude, nous avons abouti à une fluorescence résiduelle limitée de 10 à 20 %, permettant également de conclure à priori à l'obtention d'une conformation fermée en "hairpin" de l'oligonucléotide (en accord avec les valeurs issues de la littérature –(Marras et al., 2002) -). Une augmentation de fluorescence dans des conditions natives (l'oligonucléotide est placé en solution dans de l'eau et du tampon salin) signifierait une perte de sa structure autoccomplémentaire et une ouverture du substrat.

La structure "hairpin" est très stable du fait de son autoccomplémentarité, assurant un "quenching" de fluorescence maximal en solution. De plus, ce modèle permet une analyse thermostatée à 37°C, puisque la température de dénaturation (T_m) des sondes « hairpins » avoisine les 60-80°C. A des températures physiologiques, l'"hairpin" n'est pas dénaturée. La structure de la sonde permet une détection de fluorescence spécifique appliquée à l'analyse biologique *in situ*, où la température est thermostatée à 37°C.

Notons également que la détection du processus biologique (réparation enzymatique) par détection de la diminution du « "quenching" de fluorescence », s'effectue en **solution**. L'homogénéité du milieu réactionnel permet de s'affranchir des interférences éventuelles liées à l'utilisation d'un support lors d'une analyse en phase hétérogène (fluorescence intrinsèque du

support, mauvaise reconnaissance des enzymes sur des substrats immobilisés, à conformation figée, fixation non spécifique...), souvent source de biais en analyse biologique.

Si les sondes d'ADN utilisées avaient été sous forme double brin, des étapes supplémentaires de synthèse du brin complémentaire puis d'hybridation auraient pu fausser la détection, tout au moins diminuer le rapport signal / bruit. Les rendements de ces deux étapes n'atteignant jamais 100 %, un bruit de fond aurait pu être généré par la présence de fragments non appariés.

Notons également les faibles volumes et quantités utilisés, conférant à la méthode d'analyse une excellente sensibilité : même si le marquage au phosphore radioactif ne nécessite que de très faibles quantités de matériel (de l'ordre de la picomole de substrat oligonucléotidique), l'analyse par spectrofluorimétrie introduite ici ne requiert que quelques dizaines de picomoles d'oligonucléotide pour l'obtention de signaux significatifs, interprétables et quantifiables. Les volumes d'analyse pour les mesures de fluorescence ne sont jamais supérieurs à 100 µl, laissant envisager des applications totalement automatisables et à haut débit si les analyses sont effectuées en parallèle (sur un détecteur de type lecteur microplaque ou en format « lab-on-a-chip »). Sur un tel système d'analyse, le seuil de sensibilité est considérablement optimisé.

B. Analyse par fluorescence:application de notre méthode

Les résultats des expériences effectuées par spectrofluorimétrie confirment les hypothèses de départ. Nous avons mis en évidence, par étude fluorescente, l'influence du pH sur la fluorescence des groupements chromophores. Cette étude nous a permis de calibrer toutes les expériences postérieures de façon à nous affranchir de ce paramètre quelque soit le type de fluorochrome utilisé. Ainsi, à un pH de 7,6, l'étude par fluorescence est compatible avec les groupements chromophores et les enzymes utilisées. Il sera d'ailleurs intéressant dans la suite de ce travail d'inclure d'autres fluorochromes, que l'on sait insensibles aux variations de pH, engendrées par l'ajout des différents tampons enzymatiques (chromophores aux propriétés similaires à celles de la fluorescéine, de type ALEXA 488 ; ou bien encore des fluorophores appartenant à la gamme des cyanines). Ces mêmes fluorochromes devraient permettre d'améliorer le rendement de couplage et faciliter leur détection. Ces développements sont à envisager afin d'optimiser cette nouvelle méthode de suivi de réparation enzymatique et pourraient conduire au screening de nouveaux couples de chromophores (fluorophores/« quenchers ») plus robustes et plus efficaces.

L'influence de la température a aussi été mise en évidence sur le système d'analyse par suivi de diminution du « quenching » de fluorescence (cinétiques beaucoup plus lentes à basses températures, comprises entre 20 et 30°C). Ceci nous a amené à calibrer le système à une température de 37°C afin de permettre une activité optimale des enzymes de réparation ainsi qu'une dénaturation totale des fragments nucléiques générés lors de l'étape de digestion enzymatique.

L'intensité du signal de fluorescence détectée après incubation des enzymes de réparation sur le modèle "hairpin" apparaît être dépendant de la quantité d'enzyme. En raison de l'existence d'une corrélation linéaire entre la réponse fluorescente et la concentration d'oligonucléotides utilisée, il semble possible de détecter de façon **quantitative** le taux de coupures induites par les différentes concentrations d'enzymes utilisées. En effet, on a pu noter l'existence d'une relation entre la quantité croissante de Fpg et l'augmentation concomitante d'intensité de fluorescence de l'"hairpin" 8-oxodGuo Fluo; ceci est aussi vrai pour la réparation de l'"hairpin" dUrd Fluo par le couple UNG/Fpg. Ces taux de coupure sont comparables à ceux détectés par analyse par post marquage au [³²P] et EGPA (exemple de l'activité de yOGG1 sur l'"hairpin" 8-oxodGuo Fluo) rendant possible l'analyse enzymatique par fluorescence pour la détermination des constantes de vitesse relatives aux enzymes étudiées.

La technique par suivi de fluorescence, en raison de sa robustesse et de l'obtention de résultats en temps réel, offre la possibilité d'étudier la séquence d'un mécanisme d'action enzymatique complexe, impliquant au moins 2 acteurs enzymatiques. Ainsi, ce principe nous a permis de mettre en évidence la nécessaire prévalence de l'UNG sur la lyase Fpg ou NFO dans le cas de la réparation de la lésion uracile. Ce n'est qu'après l'action de l'UNG qu'une endonucléase ou une AP lyase peut inciser le site abasique précédemment formé.

Enfin, cette technique nous a permis d'affirmer, en accord avec les résultats d'analyse par EGPA que la position de la lésion choisie sur un brin ou l'autre de l'"hairpin", n'avait pas d'influence sur l'apparition du signal fluorescent, donc sur la bonne reconnaissance et l'interaction de l'enzyme pour son substrat. Des expériences complémentaires pourraient être envisagées, impliquant par exemple le changement du positionnement de la lésion au sein d'un brin de l'"hairpin" : plus proche de l'extrémité 5' et du chromophore, ou dans une plus grande proximité de la boucle de l'épingle à cheveux. En effet, tel que l'"hairpin" est conçue, même une lésion déstabilisante pour une double hélice ne parvient pas à dénaturer le système, tant l'autocomplémentarité est forte (ratio bases G/C supérieur au ratio de bases A/T). Toutefois, dès que l'enzyme de réparation coupe le brin d'ADN, la contribution de « l'hairpin » devient

négligeable et le fragment contenant la lésion est relargué. La déshybridation totale se produit à des températures compatibles avec un modèle cellulaire physiologique, à 37°C. Il est intéressant d'envisager ce type d'analyse afin de s'affranchir au maximum des variables structurales susceptibles d'influencer les résultats.

Les expériences effectuées en fluorimétrie soulignent la bonne reproductibilité des spectres ou des signaux fluorescents (selon le type de détecteur utilisé) au cours d'une même expérience. Nous avons opté, pour plus de rigueur d'analyse, pour une étude sur microplaque 96 puits. En effet, les échantillons sont analysés en parallèle et non successivement, diminuant de fait les risques d'artéfacts dus à l'agitation inconstante du milieu réactionnel, la variation de température et d'interférences lumineuses provoquées par l'ouverture/fermeture du spectrofluorimètre... Une analyse en milieu clos est le garant d'une bonne reproductibilité d'analyse, évaluée dans nos expériences par un coefficient de variation de 1 %.

C. Fluorescence et analyse de paramètres enzymatiques

1. Détermination des caractéristiques enzymatiques

La détermination des constantes cinétiques a permis de confirmer l'intérêt de notre méthode par fluorescence pour l'analyse d'activité enzymatique de réparation par les glycosylases. Grâce aux combinaisons de fluorochromes utilisés, il est possible de suivre en direct le devenir d'une lésion spécifique au sein d'un mélange de bases modifiées. En considérant les affinités respectives des glycosylases pour leurs substrats préférentiels établies dans la littérature, nous avons déterminé par nos mesures les paramètres suivants : les constantes relatives à l'affinité de la Fpg pour la 8-oxo-7,8-dihydroguanine, ainsi que l'affinité relative de la Fpg pour le glycol de thymine. Enfin, grâce à cette analyse par fluorescence, nous avons également pu accéder aux paramètres cinétiques de l'enzyme Endo III pour le diol de thymine. Ces valeurs ont été comparées aux données existantes de la littérature. Le constat est le suivant : nos résultats divergent parfois de ceux issus de la littérature. Les valeurs de K_m et V_{max} obtenues pour Endo III diffèrent d'un facteur 10 avec celles issues de la littérature (D'Ham *et al.*, 1999), mais le rapport de ces valeurs est comparable au rapport des valeurs issues de l'analyse par fluorescence. Le peu de données expérimentales et la complexité des méthodes publiées ne permettent pas de conclure, surtout pour la mesure des activités spécifiques qui dépendent de la pureté des enzymes commerciales,

pour des conditions expérimentales similaires (mêmes conditions de pH, de salinité...). Toutefois les ordres de grandeur des rapports de ces paramètres (indiquant si l'enzyme est de type haut débit/faible affinité ou faible débit/haute affinité) sont respectés et concordent avec les données publiées (D'Ham *et al.*, 1999; Purmal *et al.*, 1998; Tchou & Grollman, 1995). Cette étude de paramètres cinétiques a démontré la facilité avec laquelle il devient possible et rapide de déterminer une activité enzymatique spécifique au sein d'un mélange de substrats. En effet, le soin apporté à la conception des sondes est l'élément déterminant pour une bonne application de cette technique. En décidant d'attribuer un fluorochrome spécifique à une "hairpin" contenant une lésion donnée, on cible l'activité glycosylase que l'on cherche à mettre en évidence au sein d'un mélange. Ces applications, à long terme, s'avèreront utiles pour le « screening » d'activités enzymatiques au sein d'extraits cellulaires (mise en évidence par exemple de déficiences enzymatiques) ou encore pour l'étude d'activité de protéines virales, de fonction encore indéterminée.

Notre méthode d'étude par fluorescence nous a permis de comparer les valeurs des paramètres cinétiques obtenus par analyse graphique ou par traitement par un logiciel dédié aux études cinétiques. La bonne corrélation existant entre ces deux méthodes de calculs permet de conclure à une bonne adaptation de notre détection fluorescente. La simple analyse graphique en double inverse (Lineweaver-Burke) donne accès à des paramètres cinétiques du même ordre de grandeur que ceux donnés par le logiciel. Toutefois, il est nécessaire d'augmenter la quantité de données à traiter, donc multiplier les expériences afin de réduire la dispersion des valeurs autour de la courbe de vitesse initiale en fonction de la quantité de substrat. C'est dans cette perspective que l'application de notre méthode fluorescente prend son envergure, puisque l'analyse parallélisée sera ici la clé de la rapidité, en comparaison à une analyse par EGPA classique. Le support microplaque offre dans ce cas une facilité d'utilisation et une reproductibilité qui font défaut à l'analyse par radioactivité. En effet, l'analyse radioactive, malgré une faible consommation de réactifs, est lourde à mettre en œuvre, et lente pour l'obtention de résultats. De plus, la répétition des expériences pourrait induire un biais (du à l'expérimentateur, comme des erreurs de pipetage inhérentes au matériel employé etc.) qui devient négligeable dès lors d'une analyse parallélisée par fluorescence.

2. Etude de l'inhibition enzymatique

L'analyse radioactive est toutefois utile pour confirmer la spécificité et les mécanismes d'action des enzymes étudiées, notamment lors d'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques. En effet, le recours au marquage radioactif, effectué post analyse fluorescente, nous a aidé à valider la spécificité d'action des inhibiteurs utilisés, par détection de la bande correspondant au produit de coupure après réparation. Toutefois, une fois cette validation obtenue, l'optimisation de détection de l'activité inhibitrice de molécules a été effectuée par fluorescence. Cette étude, en accord avec les travaux précédents, a montré une excellente corrélation entre les valeurs de fluorescence et la quantité de molécule inhibitrice présente en solution. Une dose croissante d'inhibiteur conduit à une diminution significative du signal de fluorescence, indiquant la diminution d'affinité de l'enzyme pour son substrat (pour une inhibition par compétition) ou la perte quasi-totale d'activité (inhibition de réparation par empêchement de la fixation dans le site actif de l'enzyme) de cette dernière. Ce phénomène a été observé à la fois sur un système enzymatique « simple » (“hairpin” 8-oxodGuo Fluo en présence de Fpg traités par le duplex 5'Fluo 8-oxodGuo/3'dCyt Dabcyl), ainsi que sur un système de réparation plus complexe (faisant intervenir l'UNG et la Fpg sur l'“hairpin” dUrd Fluo, en présence de l'inhibiteur de l'UNG : l'UGi). Ici encore, la visualisation des activités inhibitrices enzymatiques par fluorescence démontre l'efficacité de cette approche en terme de détection. On pourra envisager dans le futur son application à la détection haut débit d'activités inhibitrices de nouvelles molécules, à l'inverse, au screening de substrats pour des molécules supposées inhibitrices...Pour des raisons cliniques, le système d'analyses à haut débit d'activité d'inhibition spécifique pourrait trouver des applications dans la recherche de molécules anti tumorales ou anti virales. Enfin, le marquage par différents fluorochromes permettrait l'analyse de plusieurs activités inhibitrices de manière simultanée, complétant l'éventail des possibles applications de cette méthode fluorescente.

D. Etudes d'activités de réparation par BER à partir d'extraits cellulaires

Les résultats de nos études préliminaires confirment les hypothèses de travail que nous avons formulées et qui étaient à la base du projet: il apparaît possible de quantifier un taux de coupure lié à une activité de réparation de lésions de l'ADN par excision de base, sans avoir recours au marquage radioactif et à l'électrophorèse, en utilisant de manière plus simple la technique de

fluorescence. Nos analyses ont porté sur des substrats totalement contrôlés et caractérisés, à savoir, nos sondes "hairpins", et essentiellement sur des enzymes purifiées. Toutefois, dans un but ultime d'utilisation de ces sondes en analyse clinique, nous devons considérer la robustesse de notre approche en appliquant la méthode à la détection et à l'étude d'activité de réparation au sein d'extraits cellulaires, milieux réactionnels plus complexes. Pour ce faire, nous avons étudié l'activité de réparation de l'uracile par des extraits de bactéries (extraits de *E.coli*), puis de mammifères (extraits de cellules HeLa ou de cellules CHO). Le projet d'étude de la réparation par les extraits cellulaires ainsi que les résultats que nous avons obtenus nous ont confortés dans notre démarche. En effet, l'utilisation des sondes a permis de discriminer les activités de dégradation non spécifique des activités de réparation par des glycosylases spécifiques. La sonde "hairpin" dGuo Fluo incubée en présence de quantités croissantes d'extraits a permis d'établir le « bruit de fond » de dégradation non spécifique, dû aux nucléases présentes dans les extraits bactériens ou de mammifères. La sonde "hairpin" dUrd Fluo a servi de témoin positif de réparation. Mise en présence des mêmes quantités d'extraits, les signaux de fluorescence enregistrés pour cette dernière se sont avérés significativement plus élevés, synonymes d'une activité de coupure supplémentaire à celle induite par les nucléases. La différence des deux types de signaux a été attribuée à la réparation spécifique de l'uracile, c'est-à-dire à son excision par l'UNG. Afin de confirmer notre hypothèse, une analyse par EGPA après post-marquage au [³²P] a été réalisée afin de mettre en évidence la coupure spécifique au niveau du 29-mère, fragment théoriquement généré par l'action de la glycosylase spécifique de la base endommagée. L'apparition d'un fragment plus court, migrant au niveau attendu du 29-mère atteste de l'interaction des glycosylases et AP lyases contenues dans les extraits vis-à-vis de leurs lésions préférentielles ainsi que de l'excision spécifique de ces dernières. De même, une approche parallèle et complémentaire a consisté à bloquer la voie d'excision de l'uracile via l'UNG par l'inhibiteur spécifique de l'UNG : UGi et à observer les signaux de fluorescence. En présence de l'inhibiteur de l'UNG, les signaux de fluorescence de la sonde "hairpin" dUrd Fluo, traitée par des doses croissantes d'extraits (d'extraits de *E.coli* ou de cellules Hela), retrouvent un taux « basal », correspondant à celui du bruit de fond dû à la dégradation non spécifique relevés pour l'"hairpin" dGuo Fluo, dans les mêmes conditions expérimentales. Ceci constitue une preuve a posteriori du blocage spécifique de la voie d'excision de l'uracile, et par là même de la réparation de cette base par les enzymes contenues dans ces extraits cellulaires. Ces expériences permettent de conclure positivement sur la validité des nos sondes en tant qu'outils de tests rapides (il suffit d'1h30 pour l'obtention parallélisée des résultats correspondants aux différentes conditions testées et de 2h supplémentaires pour la préparation des plaques et l'exploitation des

résultats) et spécifiques (détection d'une activité de réparation précise d'une lésion, ici celle de l'uracile).

Des expériences complémentaires ont été effectuées afin d'étudier les cinétiques respectives de réparation d'un mélange d'«hairpins» lésées ("hairpin" dUrd Rhod et "hairpin" 8-oxodGuo Fluo) traité par des quantités croissantes d'extraits cellulaires eucaryotes. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence le profil de réparation pour chaque lésion, de façon individuelle au sein du mélange réactionnel, en sélectionnant les longueurs d'ondes de détection des signaux. Ces études ont permis d'accéder rapidement à un reflet de l'activité d'au moins deux glycosylases contenues dans un même extrait (ici hOGG1 et UNG) en une seule étape analytique. Cette approche permet ainsi d'augmenter les vitesses d'analyses. En effet, si l'on mélange 3 fluorophores portés par trois "hairpins" différentes, chacune contenant une lésion spécifique, la détection de la fluorescence aux 3 longueurs d'ondes permettra le suivi de l'activité de réparation de chaque lésion, individuellement au sein du mélange. Ces capacités d'analyses permettent un dosage des activités de réparation propres et spécifiques à un extrait cellulaire donné pour une lésion précise, et on peut aisément imaginer l'avantage de leur utilisation en terme de recherche clinique. Un point important reste toutefois à considérer : la reproductibilité des résultats selon le type d'extraits utilisé dépend de la façon dont ce dernier a été préparé. Certaines étapes dans cette préparation peuvent en effet diminuer ou au contraire activer certaines enzymes, biaisant ainsi les résultats. Il sera alors primordial de créer un système d'étalonnage interne propre à chaque type cellulaire. Il faudra de même calibrer la quantité de sondes à utiliser pour quantifier l'activité enzymatique de l'extrait considéré. En effet, les expériences précédentes ont mis en valeur le phénomène suivant : pour une concentration en sonde de 50 nM, le taux de réparation de l'uracile atteint 40 % pour 5 µg d'extraits de *E.coli*, alors que pour 100 nM de sonde, ce taux chute à 23 % dans les mêmes conditions. L'incubation de 50 nM de sonde dUrd Fluo avec 5 µg d'extrait de cellules HeLa conduit à une excision d'environ 70 % de lésion uracile alors que 100 nM de cette même sonde n'entraîne une réparation estimée à seulement 50 % dans les mêmes conditions expérimentales. L'importance d'une calibration précise devient donc évidente afin d'étalonner correctement le système de quantification pour établir des comparaisons.

E. Miniaturisation du système d'analyse en format « lab-on-a-chip » (puce EWOD)

Dans un but de miniaturisation, de gain de sensibilité et d'optimisation maximales, notre étude de détection d'activité enzymatique par fluorescence en phase homogène a été menée en parallèle dans un format tube classique (une solution de substrat mise en présence d'une solution d'enzyme) et sur micro support (puces EWOD). En amont des expériences par fluorescence, le support conçu a fait l'objet de nombreuses mises au point et améliorations techniques, tant dans la conception du support, que dans les systèmes de détection optiques. L'étude par fluorescence a été mise en œuvre en tant que projet de valorisation du support créé, grâce à une collaboration entre le laboratoire du LETI/DTBS (micro technologies appliquées à la santé) et le laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques. Les tests réalisés en amont de nos expériences ont concerné l'optimisation des circuits intégrés, la forme des puces et des réservoirs à leur surface, la formation des « nano-gouttes » et le déplacement de ces dernières à la surface du support. La reproductibilité de dispensation des gouttes a été évaluée et les coefficients de variation estimés à 3 % pour des volumes n'excédant pas 60 nl (Fouillet *et al.*, 2005). Des problèmes de mobilité des gouttes contenant des composés biologiques (protéines, ADN, extraits cellulaires) à la surface des puces ont été rencontrés nous ont conduit à inclure des tensioactifs dans les solutions utilisées, paramètres à prendre en compte lors de la mesure des activités biologiques. Ainsi, toutes les expériences de reconnaissance spécifique entre enzyme et substrat "hairpin" ont été effectuées en présence de Tween afin de vérifier la compatibilité chimique et biologique des différents réactifs. Le signal fluorescent obtenu avec le Tween ne différant pas de celui recueilli sans le tensioactif, les études enzymatiques ont pu être effectuées sur les puces EWOD. Les conclusions sont les suivantes : les champs électriques appliqués pour le déplacement des gouttes en surface du support ont permis le déplacement de solutions d'ADN (les substrats "hairpins" en solution) ainsi que les solutions protéiques (enzymes purifiées). La fluorescence résiduelle des "hairpins" mesurée à l'aide du microscope ne varie pas avant ou après les déplacements liés au passage du courant électrique. La conformation de l'"hairpin" reste donc stable. Les signaux de fluorescence ont pu être détectés après coalescence des gouttes contenant les enzymes et de celles contenant les substrats "hairpins". Les études effectuées sur puce EWOD ont permis de détecter à la fois les signaux fluorescents dus à une dégradation enzymatique non spécifique des substrats (expérience sur puce EWOD de digestion des "hairpins" par la Nucléase P1) ainsi que ceux générés lors de la réparation enzymatique des lésions : l'excision spécifique de la base endommagée (reconnaissance spécifique sur puce

EWOD de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine par la Fpg, ou de l'uracile par le couple UNG/Fpg). La présence de nombreux réservoirs sur ces puces a rendu l'étude plus simple en terme d'expérimentation. En effet, le système enzymatique plus complexe contenant l'UNG et la Fpg pour la réparation de l'uracile nécessite l'addition des deux enzymes, soit de façon simultanée (préparation préalable du mixe avant le chargement des réservoirs) soit consécutive (coalescence successive des solutions enzymatiques sur la puce). Ces réservoirs facilitent la préparation des expériences ainsi que la répartition des réactifs. Pilotées par un logiciel informatique, les gouttes se déplacent au gré de l'expérimentateur qui programme à sa guise l'ordre de la coalescence des gouttes. Cet avantage est à considérer dans l'optique d'une automatisation des analyses, puisque le biais induit par l'expérimentateur est de ce fait écarté. Toutefois, le travail en nano volume nécessite une précision dans la préparation des réactifs « stocks » (ceux destinés aux réservoirs) ainsi qu'une minutie pour le chargement des réservoirs. Cette seule étape conditionne la qualité des résultats détectés par la suite ainsi que leur reproductibilité.

La suite des expériences menées sur cette puce ont eu pour but de mettre en évidence la relation liant la quantité d'enzyme agissant sur l'"hairpin" et le signal fluorescent généré et détecté. La détection EWOD a mis en évidence une augmentation de fluorescence corrélée à une augmentation d'enzyme en solution. A partir de ces observations, nous avons de même réussi à accéder à des paramètres enzymatiques après expérimentations à différentes concentrations de substrats (pour une concentration fixe d'enzyme). Les résultats obtenus sont probants, bien que différant en moyenne d'un facteur 10 avec ceux obtenus par détection en format microplaque. Les raisons de cet écart résident au moins pour partie dans le manque de répétitions des expériences sur puce. En effet, la haute technicité liée au support et le prix en découlant ne permet pas pour l'instant une utilisation indéfinie des puces. Le revêtement de surface s'altère probablement consécutivement aux lavages effectués après une expérimentation, conduisant à une baisse de sensibilité de détection du système (perte de l'activité enzymatique, compensée par l'ajout de BSA pour une meilleure conservation pendant l'analyse) ainsi qu'à l'arrêt du déplacement des gouttes. De plus, le changement de montage relatif au changement de puce peut également induire des perturbations dans la reproductibilité des expériences (installation du Pelletier pour réguler la température du système par exemple). Ces raisons ont conduit à l'obtention d'une seule série de résultats pour la détection des paramètres cinétiques de la protéine Fpg. Une quantité plus importante de données aurait probablement conduit à un résultat plus proche de celui estimé en format microplaque, en raison de la diminution de l'écart type corrélé à chaque lecture de fluorescence. Toutefois, on peut souligner les potentialités analytiques d'un tel microsystème : grâce à la présence de nombreux réservoirs sur la puce,

l'analyse parallélisée est absolument possible. De plus, le logiciel permet, grâce aux activations séquentielles des nano circuits, de déplacer sélectivement les réactifs. Les volumes utilisés sont moins importants que ceux utilisés pour des analyses par radiomarquage (environ 100 nl contre 10 μ l). Enfin, le système de dispensation des nano gouttes permet une précision volumétrique, gage d'une bonne reproductibilité et d'une plus grande homogénéité de résultats. Une automatisation de notre méthode d'analyse apparaît donc possible. Notons également que le système des puces EWOD est capable de détecter l'activité inhibitrice de l'UGi, validant de ce fait son éventuelle application comme outil de screening à haut débit pour de l'analyse en recherche clinique.

II. Conclusion

Nous avons montré, qu'il s'agisse de recherche fondamentale ou directement appliquée au domaine biomédical, que cette approche expérimentale d'étude par fluorescence des capacités de réparation de l'ADN permet un suivi d'activité enzymatique instantanée, en temps réel. Cette rapidité d'analyse, couplée à une miniaturisation et une automatisation, offre des possibilités nouvelles pour l'utilisation comme test de biologie médicale/hospitalière.

La puissance d'analyse de la méthode permet à la fois une détection qualitative mais aussi l'obtention de résultats quantitatifs d'une extrême précision (les CV sont compris entre 0,2 % et 10 % sur toutes les expériences effectuées) avec une rapidité qui repousse les limites imposées par les études classiques avec recours au radiomarquage. Des progrès significatifs ont été effectués en terme de synthèse chimique d'oligonucléotides contenant des lésion nucléiques (Gasparutto *et al.*, 2000; Ide, 2001; Kamiya, 2003; Wang *et al.*, 1998). Par conséquent, l'utilisation de sondes oligonucléotidiques modifiées contenant un ou plusieurs sites endommagés constitue une approche intéressante pour l'évaluation des caractéristiques structurales et du rôle biologique des lésions de l'ADN. Cette capacité à modifier des substrats oligonucléotidiques en des sites spécifiques permet une investigation précise des propriétés mutagènes et de leurs spécificités de réparation, des effets de séquences affectant les processus de réparation et de mutagenèse, ainsi que l'étude des mécanismes d'action et de la spécificité des enzymes de réparation ou encore de la détermination de leurs constantes cinétiques. Certaines pathologies liées à des déficits enzymatiques pourraient ainsi être détectées par mise en évidence d'une variation du signal de fluorescence de la sonde oligonucléotidique substrat lors de la mise en présence d'un extrait protéique, issu d'un prélèvement biologique d'un patient. De même, les tests pour un diagnostic anténatal ou une analyse génétique pourraient voir le jour sur ce principe de sondes FRET.

Appliqué à l'étude des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN, le suivi de la diminution du « quenching » de fluorescence de nos sondes donne accès de façon indirecte à l'ordre d'action des enzymes de réparation étudiés, ainsi qu'aux différentes caractéristiques cinétiques les définissant. Même si les améliorations à apporter sont encore nombreuses (études de stabilité des substrats dans le temps ou les extraits cellulaires, effets de séquence sur la position de la lésion ou influence du groupement chromophore dans l'encombrement stérique..), l'optimisation de cette technique pourrait conduire à des développements dans le domaine des bio- et même

nanotechnologies, à la fois pour la recherche fondamentale et appliquée ; les débouchés dans le domaine biomédical seraient potentiellement multiples et d'exécution bien plus aisée. L'apport d'une mesure de fluorescence dans un format lecteur microplaque constitue une étape vers la parallélisation du système analytique, avec un gain de temps considérable. Toutefois, même si les quantités analysées sont faibles, elles demeurent toujours au moins 5 à 10 fois plus élevées qu'en analyse radioactive. L'étape d'optimisation ultérieure consistera à miniaturiser le système (comme un format lecteur PCR quantitative ou format micro puce EWOD par exemple) tout en gardant les qualités de détection qui caractérisent notre méthode à ce jour.

L'utilisation du principe de FRET sur des sondes d'ADN synthétique souffre toutefois de certaines limitations. En effet, la synthèse chimique permet l'obtention d'un modèle bien défini, totalement contrôlé, identifié et modulable à volonté. Ces conditions sont idéales. Toutefois, elles ne tiennent pas compte dans le milieu cellulaire, de la présence d'éventuels inhibiteurs ou effecteurs de la réparation, de protéines liées à l'ADN (histones)...Ce modèle d'étude reflète-t-il de façon correcte les conditions physiologiques ? Est-il adapté à l'étude sur des cellules entières voire sur des échantillons de sang total ? Quand pourrait-on envisager une application clinique ?? C'est dans ce cadre que nous avons tout d'abord initié une étude concernant la l'adaptation de nos sondes aux d'extraits cellulaires. Comme nous l'avons souligné, nos sondes ont permis la mise en évidence d'activité de réparation même à bas niveau (exemple de l'excision de l'uracile par un extrait de cellules Hela estimée entre 40 et 50 % dans nos conditions expérimentales et avec ce lot d'extraits). Cette constatation nous permet d'envisager l'application de notre approche à l'étude *in cellulo*. Toutefois et contrairement à ce qui a été publié parallèlement à l'établissement de nos résultats et utilisant le même style de substrat (équipe de J.Laval, article paru en 2004 (Maksimenko *et al.*, 2004) utilisant des ADN synthétiques fluorescents mais contenant plusieurs lésions identiques au sein de la même structure), l'utilisation de ces sondes pose encore des problèmes. En effet, nos expériences (*résultats issus du stage de Master 2 de M. John Rendu, effectué au laboratoire, cf. annexe 1*) ont soulevé plusieurs questions, notamment en terme d'optimisation de transfection et semblent démontrer le manque de fiabilité de ce concept *in cellulo*. Les durées de transfection envisagées sont longues (première lecture de fluorescence à 5 h post transfection) alors que les cinétiques en fluorescence menées sur lecteur microplaque sont effectuées immédiatement après mise en contact des enzymes (ou des extraits cellulaires ou nucléaires) et de leur substrat. Ce délai est sans doute trop long pour observer une voie de réparation qui ne nécessite qu'une trentaine de minutes pour être induite et de 1 h à 3 h pour éliminer totalement une lésion par excision de

base. Devrons-nous modifier le design de nos sondes pour mieux les protéger de l'attaque des nucléases si nous souhaitons les utiliser *in cellulo*, voire *in vivo* ? Quels sont donc les bons paramètres temporels à prendre en compte, le ratio optimal de transfectant par rapport à la sonde transfectée pour ne pas induire trop de cytotoxicité mais permettre tout de même une analyse fluorescente significative ? Quel sera le détecteur de fluorescence le plus adapté à la quantification du signal recueilli : un lecteur microplaque, une micropuce à cellules de type EWOD ou une détection par cytométrie de flux (FACS) ?

Un autre point à développer sera probablement la validation de l'utilisation de ces sondes pour détecter des déficiences de la voie de réparation par excision de nucléotides ou NER. Le format « hairpin » est-il le mieux adapté pour ce genre d'analyse, compte tenu de la grande taille des substrats oligonucléotidiques nécessaires à l'étude de ce processus de réparation ? La conception d'un autre type de sonde, toujours en phase homogène, capable de mettre en évidence l'excision d'un fragment de 20 à 30 nucléotides de long contenant la lésion est en cours de réalisation. De plus, cet outil de détection par fluorescence pourra être utilisé dans la détection d'autres activités de réparation par d'autres enzymes que les glycosylases (*réparation des dommages alkylés par réversion par l'Alkyle Guanine Transférase, grâce à une sonde à structure originale, de type « hairpin », intégrant un site de restriction contenant la base alkylée, cf. annexe 2 : travaux de Mademoiselle Fanny Bouton, lors de son stage de Master 2 effectué au laboratoire*).

Ces questions sont autant de points clés dans les processus de validation de la méthode, qui, une fois résolues, permettront l'application potentielle en tant qu'outil d'analyse clinique. Ces projets appartiennent encore au domaine de la recherche fondamentale, même si les idées d'application clinique au diagnostic biomédicale prolifèrent. Ces résultats encourageants permettent de rapprocher l'échéance du passage de ce type de détection fluorescente d'un stade fondamental à celui d'un outil d'analyse en routine hospitalière ou pharmaceutique.

Bibliographie

- D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D., & Cadet, J. (1999) Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by *Escherichia coli* endonuclease III and Fpg proteins: kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry*, **38**, 3335-44.
- Fouillet, Y., Jary, D., Chabrol, C., Clementz, P., Lauro, D., Charles, R., Chollat-Namy, A., Gasparutto, D., & Peponnet, C. (2005) *Proc. Microtas*.
- Gasparutto, D., Bourdat, A.G., D'Ham, C., Duarte, V., Romieu, A., & Cadet, J. (2000) Repair and replication of oxidized DNA bases using modified oligodeoxyribonucleotides. *Biochimie*, **82**, 19-24.
- Ide, H. (2001) DNA substrates containing defined oxidative base lesions and their application to study substrate specificities of base excision repair enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **68**, 207-21.
- Kamiya, H. (2003) Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary. *Nucleic Acids Res*, **31**, 517-31.
- Li, J.J., Geyer, R., & Tan, W. (2000) Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, **28**, E52.
- Maksimenko, A., Ishchenko, A.A., Sanz, G., Laval, J., Elder, R.H., & Saparbaev, M.K. (2004) A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities. *Biochem Biophys Res Commun*, **319**, 240-6.
- Marras, S.A., Kramer, F.R., & Tyagi, S. (2002) Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, **30**, e122.
- Purmal, A.A., Lampman, G.W., Bond, J.P., Hatahet, Z., & Wallace, S.S. (1998) Enzymatic processing of uracil glycol, a major oxidative product of DNA cytosine. *J Biol Chem*, **273**, 10026-35.
- Sixou, S., Szoka, F.C., Jr., Green, G.A., Giusti, B., Zon, G., & Chin, D.J. (1994) Intracellular oligonucleotide hybridization detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Nucleic Acids Res*, **22**, 662-8.
- Tchou, J. & Grollman, A.P. (1995) The catalytic mechanism of Fpg protein. Evidence for a Schiff base intermediate and amino terminus localization of the catalytic site. *J Biol Chem*, **270**, 11671-7.
- Wang, D., Kreutzer, D.A., & Essigmann, J.M. (1998) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res*, **400**, 99-115.

Liste des publications et conférences

Liste des publications et conférences

Ce travail a fait l'objet de différentes publications et participations à des congrès :

Articles et Brevet :

D. Gasparutto, J. Cadet (2002) ; Brevet Français n° 02 07358 « Substrat oligonucléotidique et procédé permettant d'analyser la présence d'activités de réparation des lésions de l'ADN »

Chollat-Namy, A., D. Gasparutto, et al. (2005). "Nucleic acid biosensors for real-time monitoring of DNA repair activities by FRET." *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 7: 397-399.

Jary, D., Chollat-Namy, A., Fouillet, Y., Boutet, J., Chabrol, C., Castellan, D., Gasparutto, D., & Peponnet, C. (2006) DNA repair enzyme analysis on EWOD fluidic microprocessor. *Technical proceedings of the 2006 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show*, 2, 554-557.

Chollat-Namy, A., Gasparutto D., Cadet, J. & Favier, A. (manuscrit en cours) "Design and evaluation of fluorescent probes for real-time monitoring of base excision repair activities by a FRET assay"

Congrès internationaux:

Gasparutto, D., A. Chollat-Namy, et al. (2003). Nouvelles sondes d'ADN fluorescentes pour la détection d'activités ADN N-glycosylases par un test FRET: conception, synthèse et évaluations préliminaires. Colloque 3 R : Réparation, Recombinaison et Réplication, Giens (France)

Gasparutto, D., A. Chollat-Namy, et al. (2004). Fluorescent DNA probes to quantify DNA repair activities by FRET. XVI International Round Table, Minneapolis - USA

Chollat-Namy, A., D. Gasparutto, et al. (2004). New tools to investigate oxidative diseases caused by free radicals: fluorescent DNA hairpin to determine DNA N-glycosylase repair activities by a FRET assay. SFRR School, Spetses - Grèce

Gasparutto, D., A. Chollat-Namy, et al. (2004). Nouvelles sondes d'ADN fluorescentes pour la détection d'activités ADN N-glycosylases par un test FRET. RECOB 10, Aussois - France

Chollat-Namy, A., D. Gasparutto, et al. (2005). New nucleic acid biosensors to detect and quantify DNA repair activities by a fret assay. 9th International Conference on Environmental Mutagens, San Francisco - USA

Chollat-Namy, A., D. Gasparutto, et al. (2005). New nucleic acid biosensors to detect and quantify enzymatic DNA repair activities by FRET assay. Nanobiotechnology III, Nice – France

Chollat-Namy, A., D. Gasparutto, et al. (2006). New nucleic acid biosensors to detect and quantify DNA repair activities by a fret assay. 7èmes Winter Research Conference on Free Radical, Les Houches - France

Peponnet, C., A G. Brachet, et al. (2006). EWOD based actuation for integrating complex biological protocols (DNA repair, PCR) on lab on a chip. NanoBioEurope, Grenoble - France

Autres publications de Melle Alexia Chollat-Namy

Hininger, I., A. Chollat-Namy, et al. (2002). "Beneficial effect of an antioxidant micronutrient-enriched food on DNA damage: experimental study in rats using a modified comet assay in total blood." International Agency for Research on Cancer Scientific Publication **156**: 395-396

Hininger, I., A. Chollat-Namy, et al. (2004). "Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers." Mutation Research **558**(1-2): 75-80

Annexes

**Annexe 1 : Transfection de sondes FRET pour l'étude de
la réparation de l'ADN *in cellulo*
(M. John Rendu)**

Annexe 1 : Transfection de sondes FRET pour l'étude de la réparation de l'ADN *in cellulo*

*Cherchant à élargir le champ d'application de nos sondes FRET, nous avons cherché à tester leur capacité à rapporter des activités de réparation enzymatiques de l'ADN **in cellulo**. Ce paragraphe résume les résultats des expériences effectuées par Monsieur John Rendu lors de son stage de Master 2 BSM option Ingénierie pour la Santé et le Médicament (Université Joseph Fourier, Juin 2006). Lors de son stage, John s'est intéressé à la caractérisation et à l'utilisation *in cellulo* de plusieurs types de sondes oligonucléotidiques. Les sondes FRET décrites dans cette partie annexe ont fait l'objet d'expériences de **transfection in cellulo**. Les résultats ont d'ailleurs pointé plusieurs limitations et points d'améliorations potentielles du **système in cellulo**. L'application des sondes FRET a été étendue à l'investigation de la voie de réparation des dommages de l'ADN par excision de nucléotides (NER). A ces fins, une nouvelle sonde FRET a été synthétisée : un duplex d'ADN contenant un dimère de thymine. Voici décrits les principaux résultats obtenus par John au cours de cette étude.*

TABLE des MATIERES

I.	Mise au point des conditions de transfection des sondes nucléiques de type « hairpin » ...	212
	A. Viabilité cellulaire.....	212
	B. Rapport sonde / transfectant.....	213
	C. Durée de l'étape de transfection.....	214
II.	Etude de l'activité de réparation	214
	A. Etude de la réparation de la sonde comportant le dimère de thymine <i>in vitro</i>	214
	1. Etude de l'activité <i>in vitro</i> de la T4EndoV sur le dimère de thymine par détection des fragments de coupure par PAGE	215
	2. Etude de l'activité de réparation <i>in vitro</i> par détection fluorescente	215
	B. Etude de la réparation des sondes FRET <i>in cellulo</i>	216
	C. Expériences de co-transfection des sondes BER et NER	217
	D. Etude de la réparation dans les cellules après exposition à un stress oxydant	217
III.	Conclusion	219

Principe du projet

L'étude rapportée ici a pour but la mesure de l'activité des systèmes de réparation *in vivo* à l'aide de sondes nucléiques FRET. Pour cela, diverses sondes oligonucléotidiques ont été préparées (synthèses par chimie des phosphoramidites sur support puis purifiées par HPLC phase inverse (C18) et enfin caractérisées par différentes techniques physico-chimiques et biochimiques. Ces sondes seront introduites dans des cellules HeLa et THP1 par transfection. Toute une étape de mise au point de la transfection a été réalisée au préalable pour obtenir les conditions optimales. La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux et par microscopie. Nous avons utilisé deux types de sondes de réparation différentes ; en premier lieu des sondes ayant une base modifiée : sondes ciblant le système de réparation BER (*nos sondes FRET*), puis une sonde portant un dimère de thymine afin de mesurer la réparation de type NER. L'objectif de ce travail est multiple, tout d'abord la caractérisation de la sonde NER, la détection et la quantification de la réparation dans la cellule et la localisation de ces processus de réparation.

Les sondes utilisées ont été analysées et caractérisées par les méthodes conventionnelles qui figurent dans ce manuscrit : CLHP, CL/SM-SM (pour la vérification de l'intégration du dimère de thymine lors de la synthèse du duplex par voie chimique), MALDI-ToF, spectroscopie d'absorption UV et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (EGPA) après marquage radioactif ou par fluorescence. De plus, le duplex contenant le dimère de thymine a été caractérisé par sa température de fusion (T_m) après analyse par fluorescence.

I. Mise au point des conditions de transfection des sondes nucléiques de type « hairpin »

La mise au point a porté à la fois sur les types quantités de transfectant (3 transfectants ont été comparés) ainsi que sur le ratio ADN-hairpin/transfectant utilisé. Des tests de cytotoxicité ont permis de déterminer des conditions optimales pour l'observation de fluorescence au microscope ou au FACS

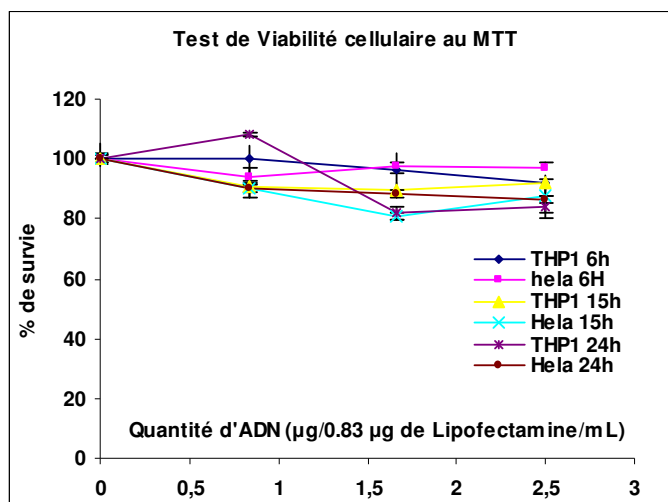
Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'utilisation de la lipofectamine. La quantité de cellules optimales a été trouvée à 2×10^5 cellules pour les deux lignées cellulaires.

A. Viabilité cellulaire

La toxicité des transfectants de type lipide cationique est multiple : d'une part ils agissent comme des détergents, d'autre part, ils peuvent activer des phospholipases membranaires et induire la génération de ROS. C'est pourquoi nous avons dû tester la cytotoxicité du transfectant et de notre sonde qui pouvait elle aussi nuire au métabolisme normal de la cellule. Le test au MTT qui permet de mesurer la viabilité cellulaire en suivant sa réduction par les électrons de la chaîne respiratoire des mitochondries actives. Le MTT de couleur jaune est réduit en un composé de couleur violette qui précipite dans celle-ci. Les cellules mortes ou apoptotiques ne possèdent plus de mitochondries fonctionnelles. Les tests de viabilité cellulaire n'ont pas montré de toxicité de la lipofectamine 2000 vis-à-vis de la lignée THP1 (viabilité supérieur à 90% de survie) jusqu'à $3.33 \mu\text{g/mL}$ (résultats non montrés). La lignée HeLa est plus fragile vis-à-vis du transfectant que la lignée THP1. En ce qui concerne de la toxicité du mixe transfectant/sonde (Figure 17) à 6h la toxicité reste faible, la viabilité restant supérieur à 90 %.

Même pour des temps supérieurs la mort cellulaire n'excède pas 20%. Or le test de réparation s'effectuant sur un temps court, inférieur à 6h, la toxicité de notre sonde pourra être négligée. Les phénomènes inhérents à la mort cellulaire ou apoptose n'interviendront pas dans notre test de réparation ou de manière négligeable.

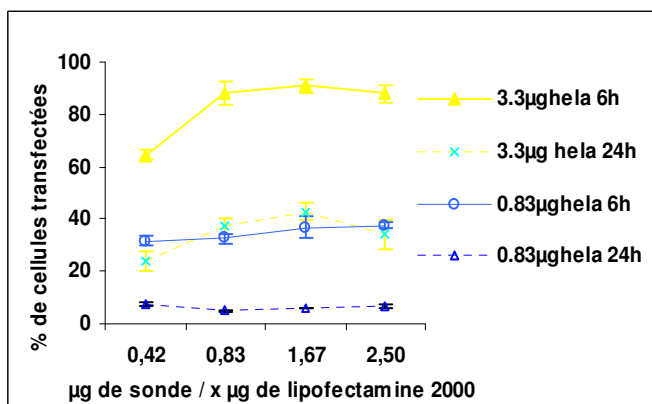
Figure 17: Test de viabilité cellulaire au MTT sur deux lignées cellulaires en présence de sondes FRET



B. Rapport sonde / transfectant

Nous avons fait varier la quantité de sonde (de 0.41 μg à 3.33 μg par mL) à quantité de transfectant fixe soit 0.83 μg soit 3.33 μg par mL (Figure 18). On s'aperçoit que la quantité de sonde n'est pas le facteur limitant de la transfection : lorsque l'on double la quantité de sonde, il n'y a pas plus de cellules transfectées. Cependant, lorsqu'on augmente la quantité de transfectant, la quantité de cellules transfectées est plus que doublée. On établit que le ratio 0.83 μg de sonde pour 3.3 μg / mL est le plus intéressant, d'une part parce que nous avons un pourcentage de cellules transfectées important et d'autre part la quantité de sonde utilisée n'est pas trop importante et donc nous permettra de réaliser un plus grand nombre de dosages.

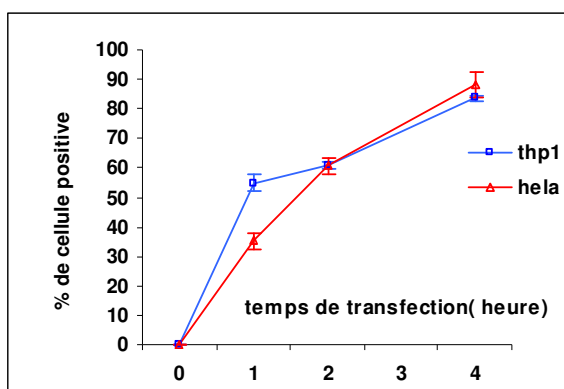
Figure 18: Influence du rapport quantité de sonde/quantité de transfectant sur le taux et l'intensité de transfection : Exemple des cellules HeLa (conclusions identiques sur la lignée de ThP1)



C. Durée de l'étape de transfection

La réparation étant un phénomène actif, il a fallu déterminer la cinétique de transfection. De plus il faut une trentaine de minute de transfection pour commencer à retrouver dans le noyau de l'ADN transfecté et le maximum de transfection de l'ADN est obtenu 4 heures après le début de la transfection [17]. Les deux lignées se comportent de la même manière (Figure 19) mais les cellules en suspension sont habituellement plus difficiles à transfecter. Toutefois notre transfection est différente de la transfection habituelle. La taille de nos oligonucléotides est à prendre en compte (plus les sondes sont petites plus la transfection est facile) ; d'autre part, la présence de la fluorescéine et du Dabcyl lipophiles permet aux sondes de traverser plus facilement la membrane cellulaire. Nous avons établi que les durées d'incubation ne devaient pas s'élever au delà de deux heures, pour avoir un bon signal et un minimum de dégradation et ou de réparation de la sonde au cours de la transfection.

Figure 19: Cinétique de transfection des deux lignées cellulaires par les sondes hairpins (0,83 µg de sonde et 3,33 µg de transfectant)



II. Etude de l'activité de réparation

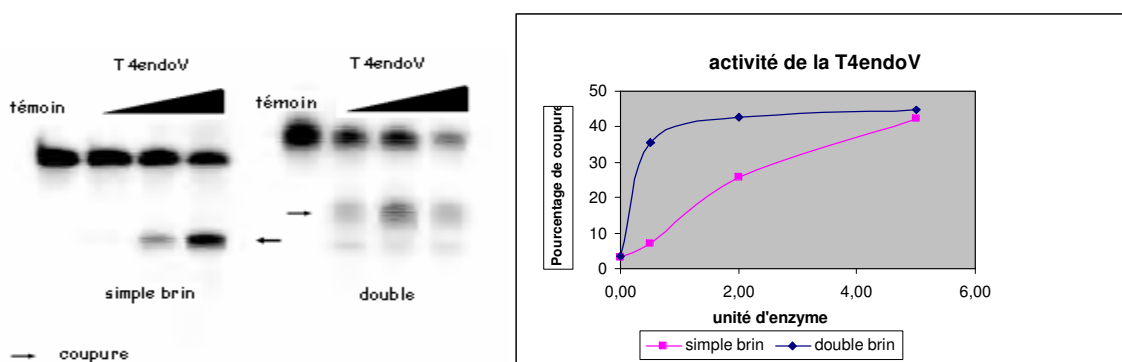
A. Etude de la réparation de la sonde comportant le dimère de thymine *in vitro*

La sonde comportant le dimère de thymine a préalablement été synthétisée chimiquement selon le même principe que les sondes « hairpins » FRET puis caractérisée par analyse sur gel et analyse fluorescente. Seuls figurent dans ce paragraphe les résultats relatifs à la réparation de la sonde in vitro. Puis une co-transfection des sondes « hairpins » dGuo Fluo (sans quencher Dabcyl ou avec Dabcyl), dUrd Fluo (avec le quencher Dabcyl), Tg Rhod et de la sonde comportant le dimère de thymine (duplex T<>T) a été effectuée dans les deux lignées cellulaires. La fluorescence a été évaluée par analyse par FACS.

1. Etude de l'activité *in vitro* de la T4EndoV sur le dimère de thymine par détection des fragments de coupure par PAGE

Les tests de coupure sur la sonde portant le dimère de thymine ont permis la mise en évidence d'un effet dose réponse entre la quantité de sonde et la concentration d'enzyme. Par autoradiographie, nous retrouvons les données trouvées dans la littérature en ce qui concerne la différence de coupure entre les deux formes : le duplex est jusqu'à 5 fois mieux coupés que le simple brin (pour 0.5 unités d'enzyme). Cependant même dans le cas du substrat double brin l'enzyme n'est pas très efficace et on obtient une efficacité maximale de coupure de 40% ,même pour des concentrations d'enzyme importantes telles 5 unités d'enzyme (cf. Figure 20)

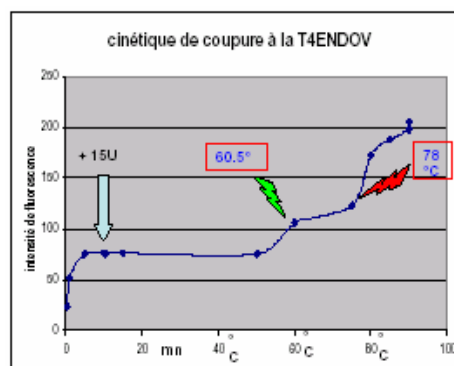
Figure 20: Analyse par EGPA (gauche) et quantification de l'activité de la T4EndoV sur la lésion T<>T



2. Etude de l'activité de réparation *in vitro* par détection fluorescente

La cinétique de coupure observée est rapide, comme le montre la Figure 21.

Figure 21: Test de coupure à la T4EndoV sur la lésion T<>T

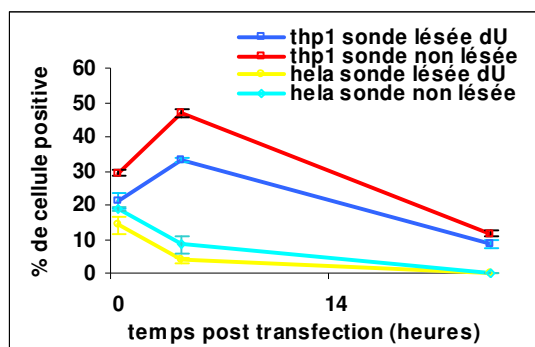


L'enzyme excise la lésion en moins de 15 minutes. La température de fusion du 15 mère provenant de la coupure de la T4endoV est de 47°C, ce qui induit qu'à la température de la réaction une partie de fragment de coupure sont encore hybridés. C'est pourquoi l'apport de chaleur a été réalisé pour ainsi libérer tout les fragment issu de la coupure. On observe sur la courbe deux points d'inflexion : un à 78°C (température de fusion du duplex) et un à 60.5°C qui correspond à la fusion de tous les fragments de coupure. L'ajout de 15 unités d'enzyme ne modifie pas le profil de coupure de la sonde. Pour être sur du quenching de la fluorescence, 1.5 équivalents de sonde portant le quencher ont été ajoutés ; or la sonde porte aussi la lésion, on pouvait donc trouver dans le milieu lors de la réaction 10 picomoles de sonde sous formes doubles brins et 5 picomole de sonde simples brin. La T4 endoV a du répartir son activité sur les deux types de sondes cela aurait pu induire un léger biais mais puisque la T4endoV coupe préférentiellement les formes doubles brins ce phénomène a pu être considéré comme négligeable.

B. Etude de la réparation des sondes FRET *in cellulo*

Les cinétiques de réparation des sondes dGuo Fluo et dUrd Fluo sont présentées sur la Figure 22 suivante.

Figure 22: Cinétique de réparation des sondes dGuo Fluo non lésée et dUrd Fluo lésée après transfection selon le type cellulaire observée par FACS

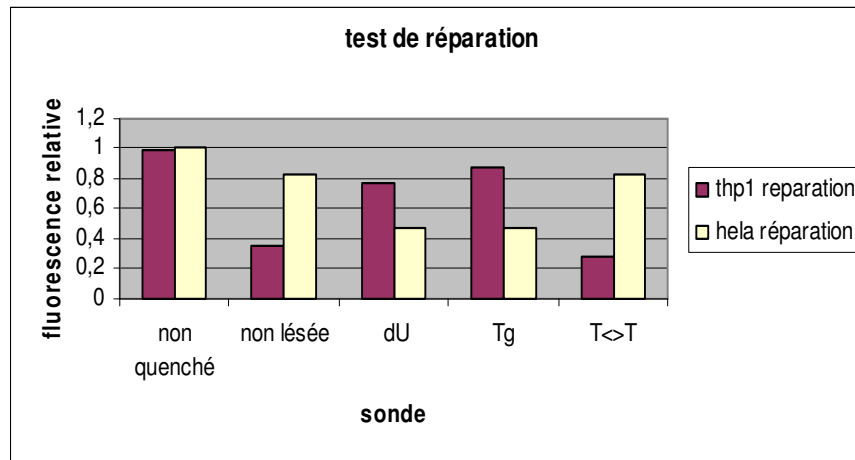


Nous observons deux résultats opposés dans les deux types cellulaires. Tout d'abord pour les cellules THP1 (courbes bleue et rouge), on observe une augmentation du pourcentage de cellules fluorescentes pendant les 4 premières heures post-transfection, les deux sondes lésées et non lésées se comportent de la même manière ce qui nous fait dire que dans les conditions expérimentales utilisées et pour les temps observés nous avons plus une dégradation non spécifique qu'une réparation. La moyenne de fluorescence des cellules augmente durant les 4 premières heures. A 24 h post-transfection, le pourcentage de cellules fluorescentes est divisé par deux, étant donné le temps de doublement des cellules qui est de 24 heures ; nous n'avons pas ou peu perdue de fluorescence. Pour les cellules HeLa (courbes bleu clair et jaune), on observe une diminution de fluorescence pendant toute la cinétique alors que l'on devrait s'attendre à une augmentation. En comparant les intensités moyennes de fluorescence après une transfection d'une sonde non quenchée et quenchée on observe deux intensités du même ordre dans les cellules HeLa. On peut donc dire que les sondes sont ouvertes très rapidement dans ce type cellulaire, sans doutes par des hélicases et des nucléases. La chute de fluorescence est apparemment due à la dégradation de la fluorescéine ou à un efflux de la sonde par des systèmes d'export type MDR. Nous avons donc opté pour des temps de transfection et une incubation plus courts.

C. Expériences de co-transfection des sondes BER et NER

Nous avons pris en compte lors de l'analyse, l'intensité moyenne de fluorescence des cellules sélectionnés en utilisant la formule suivante pour normaliser les données $((U\%_{gated} * \text{mean}U) - (N\% * \text{mean}N)) / ((L\%_{gated} * \text{mean}L) - N\% * \text{mean}N)$. U correspondant aux cellules très positives (fluorescence moyenne $\text{mean} > 500$), N aux cellules négative et L aux cellules fluorescentes (cellules positives). On prend comme unité la fluorescence relative de l'hairpin non quenchée. Les résultats du test de réparation sont exposés dans la Figure 23.

Figure 23: Expérience de co-transfection et suivi de la dégradation et réparation des sondes BER et NER



Pour les Thp1 on observe une différence de fluorescence entre les différentes sondes, la population transfectée par la sonde dGuo Fluo (non lésée) est moins fluorescente que les autres, ce qui nous permet de penser que nos sondes ont été réparées. Par contre le dimère de thymine ne semble pas avoir été coupé (fluorescence relative du même ordre que la sonde non lésée). Ceci n'est pas pour nous surprendre car des études sur des cellules exposées aux ultraviolets ont montré au laboratoire que la réparation des dimères de thymine est très longue et demande au moins 48 heures.

Pour les cellules Hela on observe des différences de fluorescences notables. On trouve des valeurs de fluorescences pour la sonde non lésée dGuo Fluo et le duplex comportant le dimère de thymine supérieures aux fluorescences relatives des sondes de réparation ce qui voudrait dire que la réparation chez les cellules Hela est encore plus précoce que dans les THP1. Une fois la sonde coupée, il ne reste qu'un fragment linéaire portant la fluorescéine de quelques bases et il est compréhensible que nous ayons une baisse de fluorescence puisque la demie vie des petits oligonucléotides est très courte mais des études complémentaires doivent être réalisées.

D. Etude de la réparation dans les cellules après exposition à un stress oxydant

Dans les conditions précédentes, nous avons observé une augmentation de fluorescence dans les cellules THP1. C'est pourquoi, ces cellules ont été irradiées par UV A pour essayer de mettre en évidence l'effet d'un stress sur la cellule. La sonde 1 nous a servis de témoin positif de

transfection et les sondes dUrd Fluo et Tg Rhod ont été utilisées pour mesurer la réparation. La mesure de fluorescence relative est calculée de la manière suivante :

$$\text{Fluorescence relative} = (\text{LR}\% \text{gated} * \text{mean LR} + \text{UR}\% \text{gated} * \text{mean UR}) / (\text{UL}\% \text{gated} + \text{UR}\% \text{gated})$$

Les résultats des analyses par FACS sont exposés dans la Figure 24 et les diagrammes correspondant à la quantification relative des signaux de fluorescence sont dans la Figure 25.

Figure 24: Analyse par FACS d'une co-transfection dans les cellules THP1 des sondes Tg Rhod et dUrd Fluo ; Stress UV A 40J/cm²

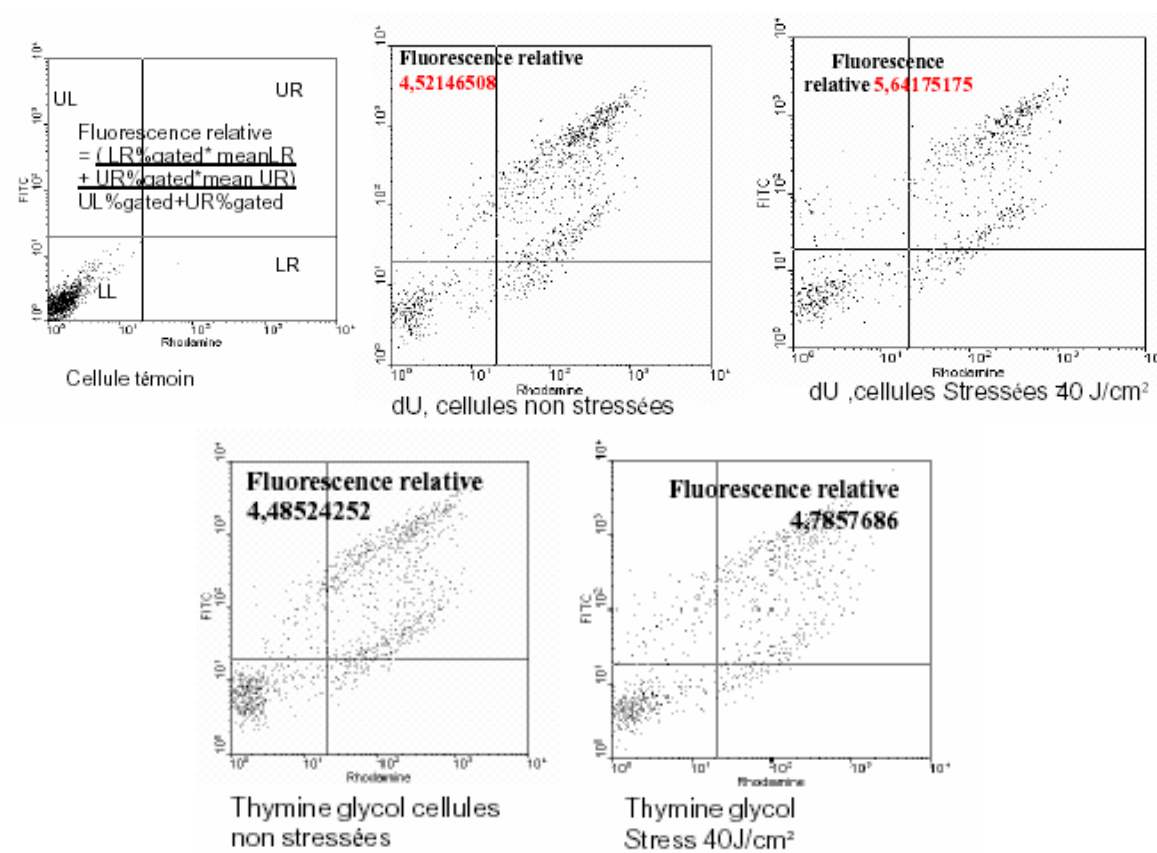
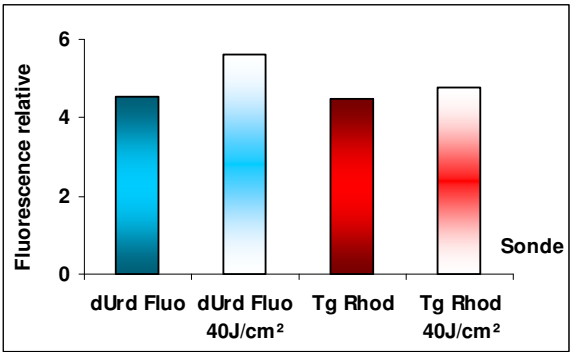


Figure 25: Représentation de la fluorescence relative des sondes transfectées dans les cellules THP1 avant et après stress UV A 40J/cm²



On s'aperçoit que les fluorescences relatives des 2 populations transfectées par la sonde Tg Rhod sont similaires. Mais pour les cellules transfectées par la sonde dUrd Fluo, la fluorescence relative des cellules stressée est 1.25 fois plus élevée que chez les non stressées. La cotransfection de sondes de différentes couleurs semble être une technique intéressante mais lors de la mesure nous avons eu un grand nombre d'interférences puisque la fluoescéine était en partie détectée en FL2 (filtre de la rhodamine).

III. Conclusion

La transfection des sondes dans les cellules se heurte encore à des problèmes techniques et biologiques. Nous sommes actuellement entrain de comparer la stabilité aux exo nucléases des sondes harpins par rapport à des oligonucléotides simple brin ou double brin pour mettre en évidence l'effet protecteur de la structure hairpin et des chromophores situés aux extrémités. Les premiers résultats indiquent que la structure hairpin et les groupements des extrémités offrent une protection relative. Pour la mesure de la réparation in cellulo, nous avons montré que les sondes étaient efficaces. Cependant, malgré ces résultats préliminaires positifs, nous nous sommes confrontés à un grand nombre de problème. Nos deux types cellulaires montrent une réponse totalement différente vis-à-vis des sondes de réparation il faudra optimiser les méthodes pour chaque type de cellule. Le temps de transfection est peut être trop grand pour pouvoir observer correctement l'apparition de fluorescence, il faudrait tester d'autres méthodes de transfection comme par exemple l'électroporation et la microinjection qui permettent une entrée massive de l'ADN dans les cellules en très peu de temps. D'autre part la microscopie confocale permettrait de nous renseigner sur la nature des vésicules fluorescentes et cette technique apporterait des données sur le trafic des oligonucléotides harpins dans la cellule.

En ce qui concerne la co-transfection des sondes de réparation, deux choix se présentent pour faire progresser cette technique. Il faudrait utiliser d'autres fluorophores afin de supprimer les interférences au niveau du détecteur (en FL2) sur le FACSCALIBUR. Ou diminuer l'intensité du laser pour ne détecter uniquement les cellules très fluorescentes. On peut aussi imaginer des sondes portant deux fluorophores avec par exemple le greffage d'un fluorophore dans la boucle comme témoin positif de transfection et d'un autre fluorophore différent à une extrémité pour observer le phénomène de FRET. Il serait aussi préférable de mieux protéger les extrémités des sondes vis-à-vis des exo nucléases par exemple par quelques liaisons phosphothioates sur les derniers nucléotides. La Sonde dimères de thymine sous cette forme hairpin protégée pourrait voir sa demie vie augmenter significativement et permettre d'étudier la réparation de type NER sur une journée.

En conclusion nous avons mis au point des sondes utilisables in vitro. Les applications ont été initiées avec succès avec le suivi de la réparation des défauts uracile et glycol de thymine. Les développements de ces outils analytiques et son application aux autres systèmes de réparation nécessitent un nouveau design des sondes en prenant en compte les conclusions exposées à l'issue des présents travaux. Différentes approches sont actuellement initiées au laboratoire.

**Annexe 2 : Application des sondes FRET à l'étude de la
réparation par réversion, par l'enzyme hAGT
(*Mlle Fanny Bouton*)**

Annexe 2 : Application des sondes FRET à l'étude de la réparation par réversion, par l'enzyme hAGT

Ces travaux sont le résumé des expériences menées au laboratoire dans le cadre du Master M2 spécialité MRES, Méthodes de Recherche en Environnement et Santé, Mention ISM, Ingénieries pour la Santé et le Médicament Domaine Sciences, Technologies et Santé (Université Joseph Fourier de Grenoble, Juin 2006) de Mademoiselle Fanny Bouton, avec qui j'ai pu collaborer durant ma thèse. L'étude présentée dans cette partie annexe reprend les principes de la méthode FRET ainsi que ceux de la détection fluorescente en temps réel, pour l'étude de la voie de réparation par réversion de dommages alkylés des bases de l'ADN, par l'enzyme alkyle guanine transférase (hAGT). Le substrat a été synthétisé par la même chimie que celle utilisée pour l'obtention des sondes BER. Il se présente sous forme d'une « hairpin » marquée à ses extrémités par un groupement « quencher » (Dabcyl en 3') et un groupement chromophore (FITC en 5'). Toutefois la séquence diffère puisque la sonde nucléique utilisée pour la mise en évidence de la réparation par réversion intègre un site de coupure pour une enzyme de restriction (la PstI). C'est dans ce site que la base alkylée a été insérée. Ainsi, lorsque la réparation (par réversion) de la base guanine alkylée a lieu, l'enzyme de restriction reconnaît le site de coupure et peut inciser le substrat « hairpin », donnant lieu à une apparition de fluorescence dans le milieu. Si la réparation ne se produit pas, on ne note aucune incision par l'enzyme de restriction et donc aucune variation de fluorescence. Ces expériences ont pour vocation l'extension du concept des sondes FRET à l'étude d'activités de réparation différentes de celles initiées jusqu'à présent et exposées dans le manuscrit de thèse. Voici exposé un résumé des résultats de Fanny.

I.	Présentation	224
	A.Agents alkylants endogènes.....	224
	B.Agents alkylants exogènes.....	225
	1.La fumée de tabac	225
	2.Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	225
	3.Les agents alkylants thérapeutiques	226
	C.La réparation des alkylations	226
II.	Matériel et méthodes	227
	A.Détection de l'activité de réparation de la O ⁶ -meGua par une analyse PAGE après marquage radioactif...	227
	B.Détection de l'activité de réparation de la O ⁶ meGua par analyse FRET	228
III.	Résultats	229
	A.Structure des nouvelles sondes nucléiques fluorescentes synthétisées	229
	B.Analyse des activités de coupure par spectrofluorimétrie.....	230
	1.Mise en évidence de digestions enzymatiques de la sonde nucléique non lésée « hairpin dG »	230
	a Par analyse FRET.....	230
	b Analyse par électrophorèse des échantillons par post marquage.....	231
	2.Mise en évidence de digestions enzymatiques de la sonde nucléique lésée « hairpin O ⁶ medG »	233
	C.Mise en évidence de la réparation de la lésion O ⁶ -meGua par l'enzyme AGT	234
	1.Par PAGE.....	234
	2.Par FRET.....	236
IV.	Tests d'inhibition de l'AGT par FRET : Mesure de l'inhibition de l'AGT par l'O ⁶ -benzylGuanine.....	237
V.	Conclusion.....	239

Introduction

Cette étude présente l'analyse de l'activité de réparation d'une méthylation de l'ADN sur un site privilégié des dommages alkylés : la position O⁶ de la base guanine. La lésion O⁶-méthyleGuanine est réparée par réversion par l'enzyme alkyle guanine transférase (AGT). Une nouvelle technique de détection et de quantification de cette activité de réparation est basée sur le principe de transfert résonant d'énergie fluorescente (FRET). La méthode par FRET mise au point ici pour détecter l'activité de réparation utilise un substrat oligonucléotidique innovant, synthétisé et purifié au laboratoire. La réaction de réparation à analyser suivi d'une coupure enzymatique conduit à une déstabilisation de la structure du substrat et se traduit par une émission de fluorescence. Les résultats obtenus par cette technique simple, rapide et sensible ont été comparés à ceux obtenus par la méthode classique, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

I. Présentation

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés uniquement aux activités de réparation des alkylations de l'ADN. Les individus sont exposés aux composés alkylants produits par voies endogènes et exogènes. Ces composés sont nommés ainsi car ils ont la capacité d'ajouter un groupement alkyle à un grand nombre de groupes électronégatifs, comme les acides nucléiques, en formant des liaisons covalentes. Les agents alkylants sont aussi utilisés dans les traitements chimiothérapeutiques contre le cancer. Ces agents étant potentiellement mutagènes et génotoxiques, de nombreuses recherches se concentrent sur la possibilité des agents alkylants à induire des lésions de l'ADN, leurs mécanismes d'action et leurs conséquences. Les agents alkylants forment aussi des adduits sur l'ARN et sur les protéines contribuant ainsi à leur cytotoxicité. Tous les organismes possèdent des systèmes de réparations ciblant les alkylations de l'ADN et le type de réparation dépend généralement du type de la lésion. L'alkylation intervient essentiellement au moment de la réplication de l'ADN (phase S), lorsque les deux brins d'ADN sont séparés et exposent alors les sites d'intérêt à l'action alkylante. D'après les syndromes cliniques observés, un système de réparation des alkylations de l'ADN défectueux cause généralement le cancer, le développement d'anomalies et le vieillissement prématuré (Drablos *et al.*, 2004).

A. Agents alkylants endogènes

Il existe de nombreuses sources possibles d'agents alkylants endogènes. Plusieurs composés dont la S-adénosylméthionine sont donneurs de méthyle dans de nombreuses réactions biochimiques. Ce dernier est aussi un agent méthylant sévère induisant des mutations de l'ADN. Il génère généralement des adduits -CH₃ sur les azotes de la guanine en position 7 et en position 3 de l'adénine. Il peut également méthyle l'oxygène de la guanine en position 6 ; la lésion qui en résulte est la O⁶-méthylguanine (O⁶-meGua). Ces alkylations ont surtout lieu dans les cellules intestinales, c'est pourquoi une déficience du système de réparation peut conduire à des cancers des tissus colorectaux (Drablos *et al.*, 2004).

B. Agents alkylants exogènes

1. La fumée de tabac

Il existe également d'autres voies d'alkylations. La voie exogène principale chez l'homme est représentée par l'exposition à la fumée de cigarette. (présence de nombreux composés cancérigènes dérivant des alcaloïdes présents dans le tabac dont les nitrosamines qui forment, après activation métabolique, des adduits alkylants, principalement la O⁶-meGua, dans les cellules des organes exposés à la fumée). Ces composés sont chez les fumeurs des facteurs de risque de cancers de la langue, de l'œsophage, du pancréas et des cavités orales (Hecht, 1999). L'exposition au DMS (issus des industries utilisant la chimie du SO₂), utilisé en agriculture, en pharmacie, en parfumerie ou encore dans le processus de fabrication du savon, est une source exogène non négligeable de méthylation des bases (notamment sur les positions N7 et N3 des purines).

2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

L'homme est également exposé aux HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) qui après biotransformation peuvent devenir des alkylants hautement mutagènes et clastogènes, comme le styrène. La pyrolyse et la combustion incomplète de matières organiques, comme l'incinération des déchets, la combustion du tabac, du bois, du charbon, le fonctionnement des moteurs, produisent des HAPs et exposent donc la population générale (Chang *et al.*, 2006). La Figure 26 résume les différents sites possibles pour une alkylation des bases de l'ADN.

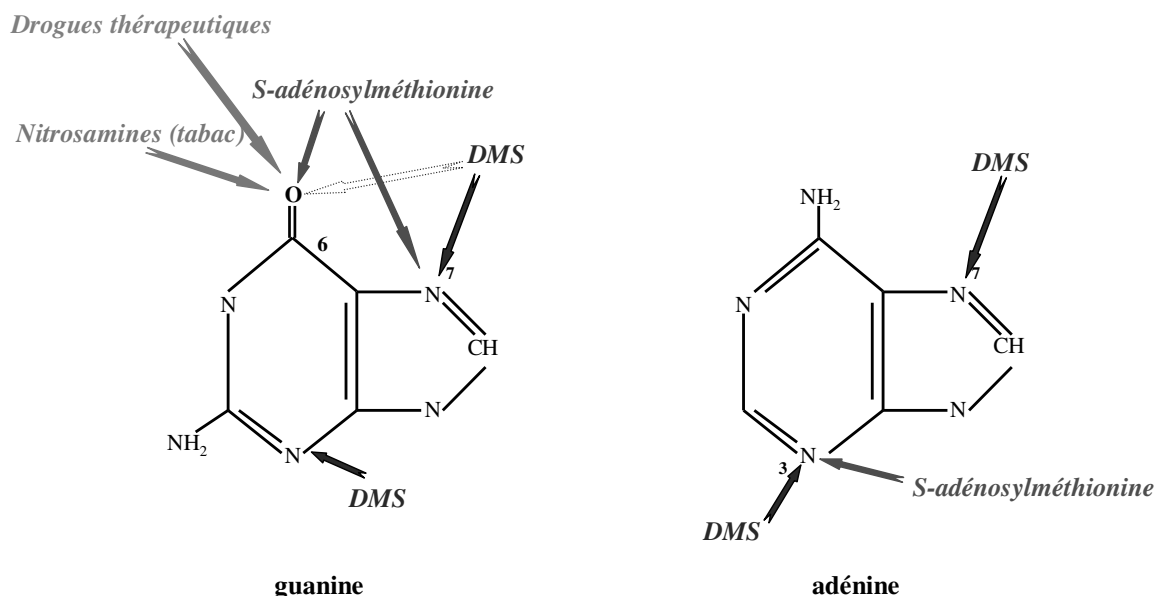


Figure 26: Localisation des principaux sites d'alkylation de l'ADN (DMS : Diméthyle Sulfate)

3. Les agents alkylants thérapeutiques

Des agents alkylants peuvent être utilisés dans les traitements chimiothérapeutiques contre le cancer dans le but d'induire la mort des cellules tumorales. La cible principale de ces médicaments est la position O⁶ de la base guanine mais plusieurs autres sites peuvent être aussi alkylés. Les agents alkylants thérapeutiques les plus utilisés appartiennent aux classes des moutardes à l'azote, des nitroso-urées et des sels de platine. Les effets de ces drogues sont fortement modulés par les processus de réparation de l'ADN. De plus, ces traitements ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses ; ils touchent aussi les cellules normales, d'où la toxicité et les nombreux effets secondaires des chimiothérapies (Drablos *et al.*, 2004).

C. La réparation des alkylations

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la lésion O⁶-meGua. Il s'agit d'une lésion qui est réparée directement par un processus de réversion par les enzymes Alkyle Guanine Transférases (AGTs). Chez l'Homme, l'enzyme mise en action est l'hAGT (human AGT). Cette enzyme a une préférence pour la lésion O⁶-meGua même si elle est capable de réparer d'autres adduits de plus grande taille tel que la O⁶-benzyle-Guanine ou encore des adduits situés sur d'autres bases (O⁴-méthyle-Thymine par exemple). Elle répare la lésion en fixant le groupement alkyle sur son site actif au niveau de la Cystéine 145. La liaison covalente qui se forme entre le site de la Cystéine et le groupement méthyle rend l'enzyme AGT inactive, prête à être dégradée par la voie de l'ubiquitine. On parle d'ailleurs d'enzyme suicide. Son taux d'activité dépend donc de la concentration de l'enzyme présente (Mishina *et al.*, 2006). Cette enzyme AGT est une métalloprotéine, elle contient une structure Zn²⁺, éloignée de son site actif mais qui a pour rôle d'améliorer le taux de réaction avec les bases endommagées de l'ADN (Duguid *et al.*, 2005).

Si les lésions alkylantes ne sont pas réparées, alors des erreurs durant la réplication peuvent apparaître. La O⁶-meGua est une lésion mutagène qui, si elle n'est pas éliminée, peut conduire à la transition G:C vers A:T (Mishina *et al.*, 2006).

Chez *Escherichia Coli* deux autres enzymes alkyltransférases ont été mis en évidence. Il s'agit des protéines Ogt et Ada. La dernière possède deux sites actifs désalkylants : un situé au niveau du domaine C-terminal et l'autre au niveau du domaine N-terminal (Meyer *et al.*, 2003; Mishina *et al.*, 2006).

Outre les alkyltransférases fonctionnant par un processus de réversion, il existe trois autres systèmes de réparation des alkylations de l'ADN :

- La réparation d'adduits méthyle sur les bases peut aussi se faire par déalkylation-oxydative par l'action d'une enzyme nommée AlkB. C'est un système de réparation directe au cours duquel l'enzyme oxyde le groupement alkyle lorsqu'il est placé préférentiellement sur une guanine, en utilisant les ions Fe²⁺ comme cofacteurs (Mishina *et al.*, 2006).
- Les deux autres systèmes de réparation sont les processus d'excision par excision de bases (BER) et par excision de nucléotides (NER) dans les cas de gros adduits alkyles (Drablos *et al.*, 2004)

Les alkylations de l'ARN sont aussi réparées mais les mécanismes sont moins bien connus. Quant aux protéines alkylées, elles peuvent être réparées à la fois au niveau de l'acide aminé et au niveau de leur structure protéique (Drablos *et al.*, 2004).

II. Matériel et méthodes

A. Détection de l'activité de réparation de la O⁶-meGua par une analyse PAGE après marquage radioactif

L'étude des activités enzymatiques de réparation a été réalisée parallèlement par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (gel à 20% d'acrylamide, urée). Les oligonucléotides ont été marqués par [γ -32ATP] : 0.5 unités d'enzyme T4 kinase (Sigma®), 0.5 μ L de [γ -32P]ATP (Amersham Biosciences), 2 μ L de tampon de réaction 5X (Forward Reaction Buffer- Invitrogen®, 350 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 5 mM 2-mercaptoéthanol) sont ajoutés à 25 pmol d'oligonucléotides, qsp 10 μ L avec de l'eau MilliQ. La réaction est alors réalisée à 37 °C pendant 30 min. Le fragment nucléique marqué est ensuite purifié sur colonne d'exclusion Microspin™ G-25 (Amersham®).

Le protocole réactionnel suivi pour les expériences de réparations enzymatiques est présenté dans la Figure 27 suivante :

Figure 27: Tableau récapitulatif pour l'analyse par EGPA en présence d'enzyme de restriction ou non

	Oligonucléotide témoin			Oligonucléotide lésé		
	Témoin	+ Pst1	+ AGT +Pst1	Témoin	+ Pst1	+ AGT +Pst1
Substrat oligonucléotidique	1,5 picomoles	1,5 picomoles	1,5 picomoles	1,5 picomoles	1,5 picomoles	1,5 picomoles
Tampon réactionnel 1X final ⁽¹⁾	1µL	1µL	1µL	1µL	1µL	1µL
Enzyme AGT ⁽²⁾			3 Unités			3 Unités
H ₂ O	3,5 µL	3,5 µL	3,5 µL	3,5 µL	3,5 µL	3,5 µL
Incubation	37 °C pdt 30'					
Tampon Pst1 1X final (3)	1µL	1µL	1µL	1µL	1µL	1µL
Enzyme restriction Pst1		20 unités	20 unités		20 unités	20 unités
Incubation	37 °C pdt 60'					
<u>Tableau 1</u> : protocole enzymatique suivi						
(1) : 100mM MgCl ₂ , 500mM KCl, 0,5% TRITON TM X-100, 10µg/mL Bovine serum albumin (BSA)						
(2) : enzyme de réparation extraite d' <i>Escherichia coli</i>						
(3) : 50mM Tris HCl, 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 1mM Dithioerythritol (DTE)						

En fin de réaction, nous avons ajouté des marqueurs de migration aux mélanges réactionnels (bleu de bromophénol / vert de xylène cyanole en solution dans la formamide) avant de les

chauffer 5 minutes à 95°C et de les déposer dans les puits du gel. L'électrophorèse a été conduite sous une tension de 1500-2000 V pendant 3 à 4 heures. Le gel a ensuite été révélé par autoradiographie (Phosphor Imager).

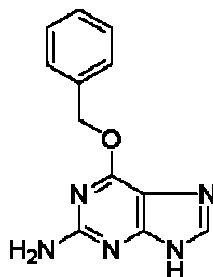
L'enzyme AGT ainsi que son tampon réactionnel ont été obtenus chez Sigma Aldrich® ; l'enzyme de restriction Pst1 et son tampon proviennent de la société Roche®.

B. Détection de l'activité de réparation de la O⁶meGua par analyse FRET

Dans le cas des suivis de cinétique de réactions enzymatiques, 10 picomoles d'oligonucléotides ont été mis en présence de différents mélanges réactionnels dans un volume final n'excédant pas les 120µL. Les enzymes et tampons utilisés sont les mêmes que ceux décrits dans la Figure 27 ; 45 Unités d'AGT et 100 Unités de Pst1 ont été utilisés.

Le suivi de la cinétique qui avait pour but d'évaluer l'effet de la O⁶-benzyleGuanine, inhibiteur connu de l'AGT, a suivi le même protocole avec une concentration de 200 nanomoles d'inhibiteur. L'O⁶-benzylGuanine (O6-bzGua) provient de Sigma Aldrich®, sa structure est précisée ci-dessous : (Figure 28)

Figure 28: structure de l'inhibiteur de l'AGT : la O⁶-benzyleGuanine (O6-bzGua)



Pour tester l'efficacité de cet inhibiteur oligonucléotidique de l'AGT, le protocole suivant a été utilisé : Les 10 picomoles de substrats oligonucléotidiques ont été mis en présence de l'inhibiteur (tests à 100 picomoles et à 500 picomoles d'inhibiteur) dans le tampon de l'AGT et avec seulement 15 Unités d'AGT. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, le tampon de la Pst1 a été ajouté ainsi que 100 Unités d'enzyme Pst1. Seule une mesure de fluorescence finale, après 60 minutes d'incubation à 37°C a été réalisée.

Le contrôle des réactions enzymatiques fluorescentes a été réalisé par post-marquage à l'ATP-[γ-³²P] dans du tampon Exchange Reaction Buffer 5X (Invitrogen®) : 250 mM Imidazole – HCl (pH 6,4), 60mM MgCl₂, 350µM ADP, 5mM 2-Mercaptoethanol.

III. Résultats

A. Structure des nouvelles sondes nucléiques fluorescentes synthétisées

La structure des oligonucléotides synthétisés est dite en “épingle à cheveux” ou “hairpin”, le brin autocomplémentaire se repliant sur lui-même au niveau de la boucle constituée de sept thymines (figure 4). La lésion d'intérêt O⁶-meGua a été insérée dans la séquence, et au niveau de cette lésion, les nucléotides ont été assemblés de sorte à former un site de coupure spécifique à l'enzyme de restriction endonucléase Pst1 (extraite de *Providencia stuartii*) (Figure 29). Cet oligonucléotide est nommé “hairpin O6meG” dans la suite de ce rapport.

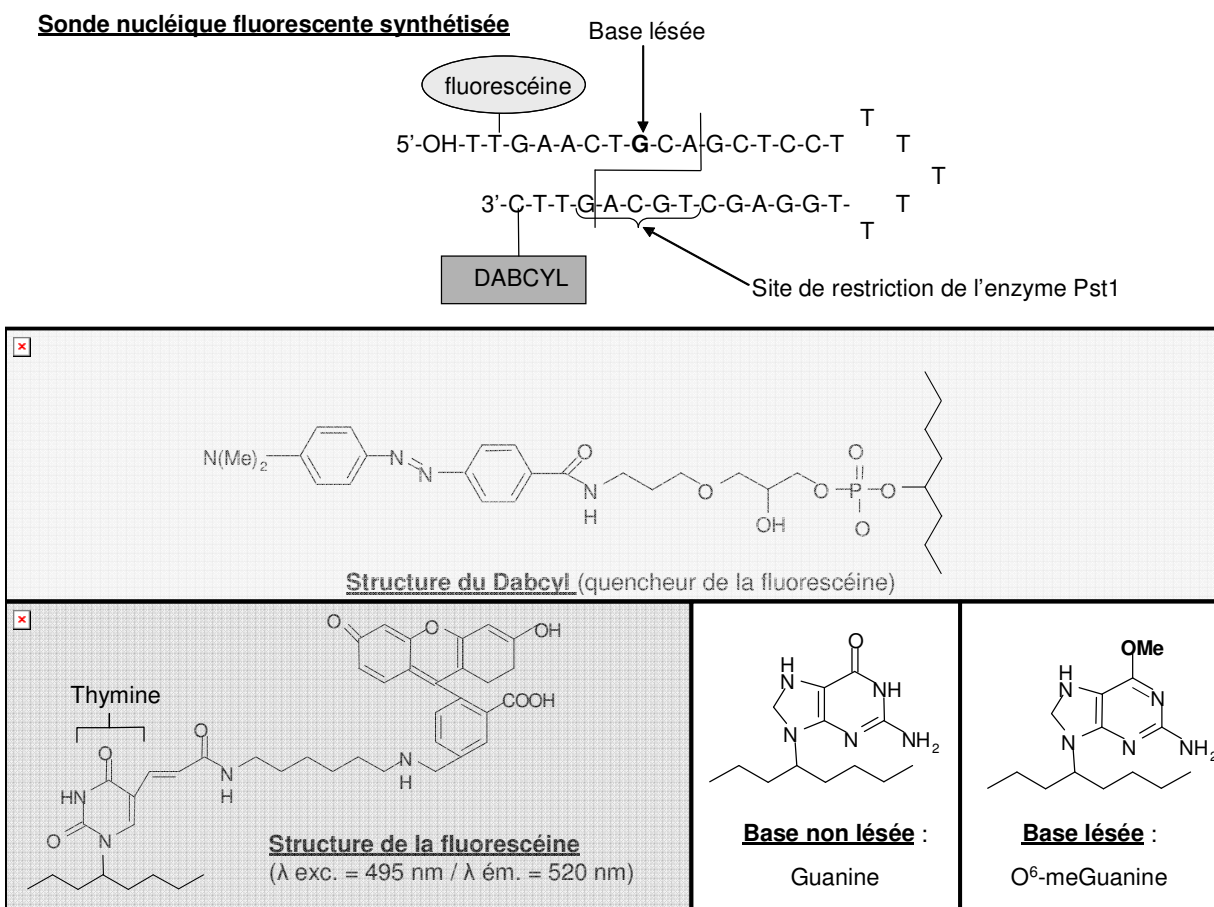


Figure 29: Structure des séquences d'oligonucléotides synthétisés contenant un fluorophore, un quencheur, le site de restriction Pst1 et la lésion d'intérêt O⁶-meGua.

Lors de la synthèse chimique des sondes, un fluorophore a été ajouté à l'extrémité 5' de la séquence, il s'agit de la fluorescéine qui émet dans le jaune. A l'extrémité 3', un quencheur a été ajouté. Ainsi, lorsque l'“hairpin” est refermée sur elle-même, le quencheur se trouve à proximité du fluorophore (à une distance inférieure à 100 Å) et absorbe la fluorescence émise (Figure 29). Nous avons utilisé le Dabcyl : 4-(4'-diméthylaminophénylazo) benzoic acid, connu pour absorber efficacement l'émission de la fluorescéine (à environ 90 %).

Un oligonucléotide témoin possédant la même structure mais sans la lésion O6méthyle, nommé “hairpin dG”, a également été synthétisé et utilisé comme référence pour les études de réparation.

Les hairpins ont également été analysés et caractérisés par les méthodes conventionnelles : HPLC, MALDI-ToF, spectroscopie d'absorption UV et analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (EGPA). La stabilité de la structure a été testée par mise en évidence de la température de fusion (T_m) par analyse par fluorescence. Seuls sont exposés ici les résultats relatifs à l'analyse par fluorescence et la comparaison par EGPA des activités enzymatiques de dégradation par la Nucléase P1 ou les activités de réparation par réversion.

B. Analyse des activités de coupure par spectrofluorimétrie

1. Mise en évidence de digestions enzymatiques de la sonde nucléique non lésée « hairpin dG »

a Par analyse FRET

L'enzyme Nucléase P1 a la capacité de digérer entièrement les oligonucléotides de façon non spécifique en libérant des nucléotides monophosphates. Dans nos conditions expérimentales rapportées dans la Figure 30, l'activité enzymatique a atteint un plateau correspondant à la digestion totale des hairpins après 12 minutes de réaction environ. L'enzyme de restriction Pst1 a agit sur l'hairpin au niveau d'un site de coupure spécifique, elle a atteint un plateau de digestion du substrat oligonucléotidique plus tardivement : à environ 20 minutes de temps réactionnel. L'action de la Pst 1 n'a pas été totale sur cette sonde, dans les conditions expérimentales présentées, puisque l'intensité relative de fluorescence maximale n'a pas atteint celle obtenue avec l'enzyme NP1. Les photos présentées dans la Figure 30 ont confirmé également ces résultats : l'émission de fluorescence était plus intense lorsque l'“hairpin dG” a été digérée par l'enzyme Nucléase P1.

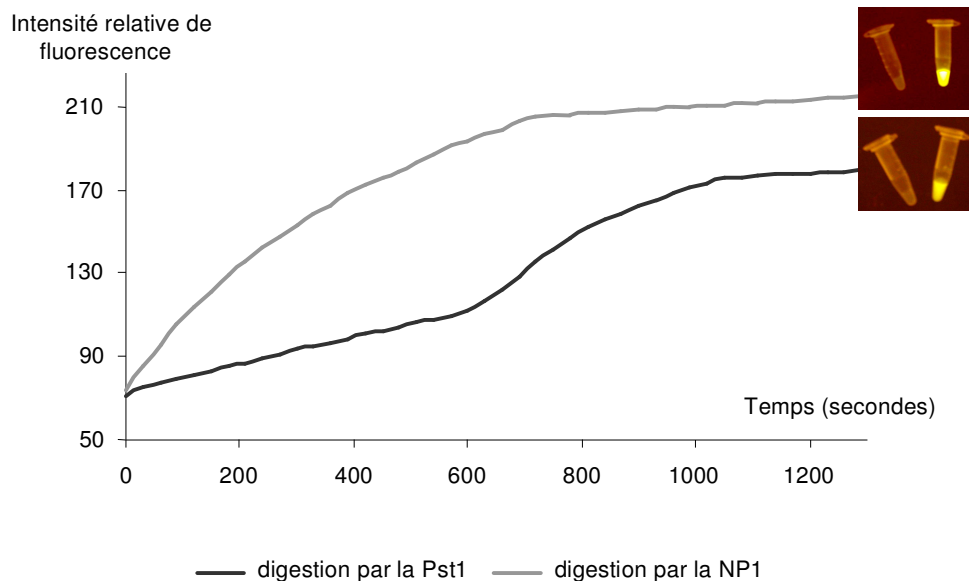


Figure 30: Cinétique de digestion de l'«Hairpin dG» (10 pmoles) par l'enzyme Nucléase P1 (dans le tampon de la Fpg ⁽¹⁾ et [NP1] = 1 Unité) et par l'enzyme de restriction Pst1 (dans le tampon de la Pst1⁽²⁾ et [Pst1] = 100 U)

⁽¹⁾ : 20mM Tris HCl pH=7,6 ; 1mM d'EDTA, 100mM KCl (tampon 1X)

⁽²⁾ : 50mM Tris HCl, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM Dithioerythritol (DTE) (tampon 1X)

b Analyse par électrophorèse des échantillons par post marquage

Les échantillons ayant servis au suivi de la cinétique de la digestion par spectroscopie de fluorescence de l'«Hairpin dG» par la Pst1 et par la NP1 ont été post-marqués au phosphore [³²P] puis déposés sur gel. Les résultats sont présentés en Figure 31.

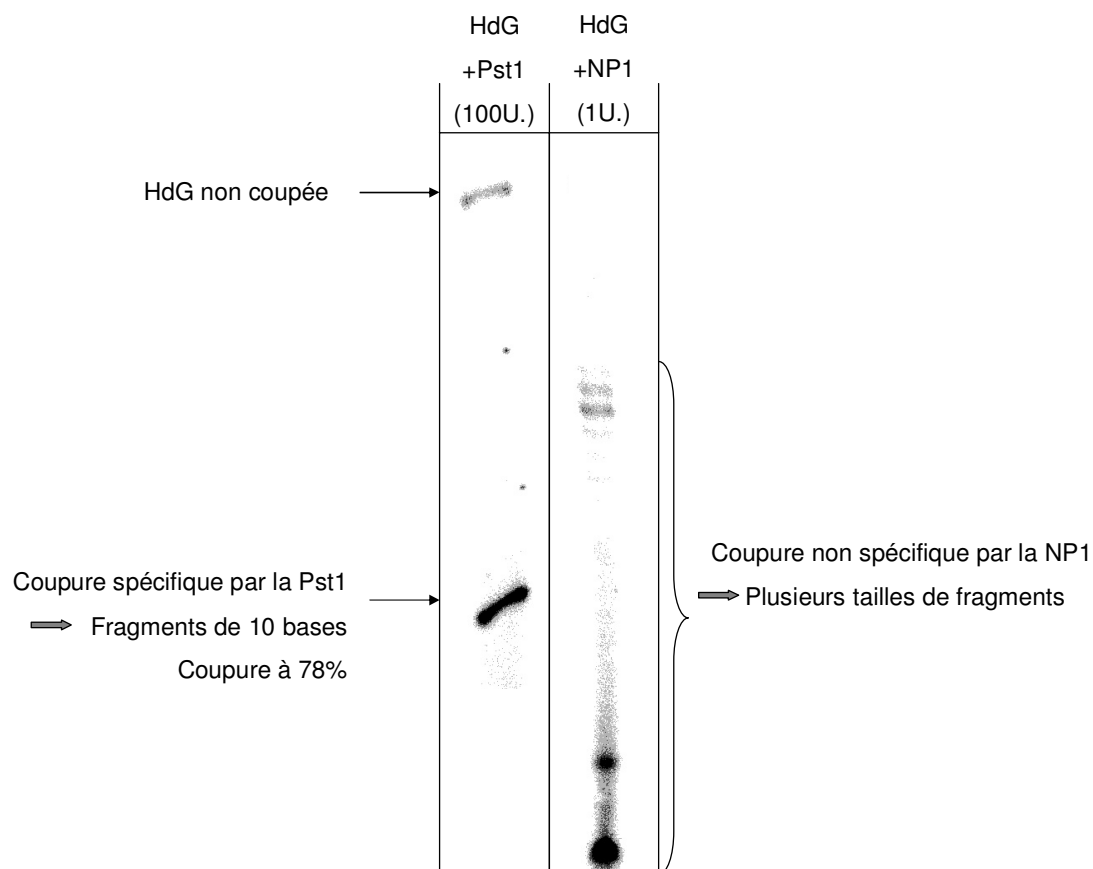


Figure 31: Autoradiographie du gel d'acrylamide représentant la migration de l'«Hairpin dG» post-marquée au ^{32}P après réactions enzymatiques avec la Pst 1 et la Nucléase P1

Les résultats obtenus par électrophorèse sur gel ont confirmé ceux obtenus par FRET : la digestion de l'hairpin par la Pst 1 n'est pas complète. De plus, l'enzyme de restriction a bien coupé de façon spécifique l'oligonucléotide avec un pourcentage de coupure d'environ 78% (selon le logiciel Quantity One). Quant à la digestion de l'hairpin par la Nucléase P1, la Figure 31 montre que cette réaction était totale. L'observation de fragments de taille hétérogène a prouvé que l'enzyme NP1 coupe son substrat nucléique de façon non spécifique.

2. Mise en évidence de digestions enzymatiques de la sonde nucléique lésée « hairpin O⁶-medG »

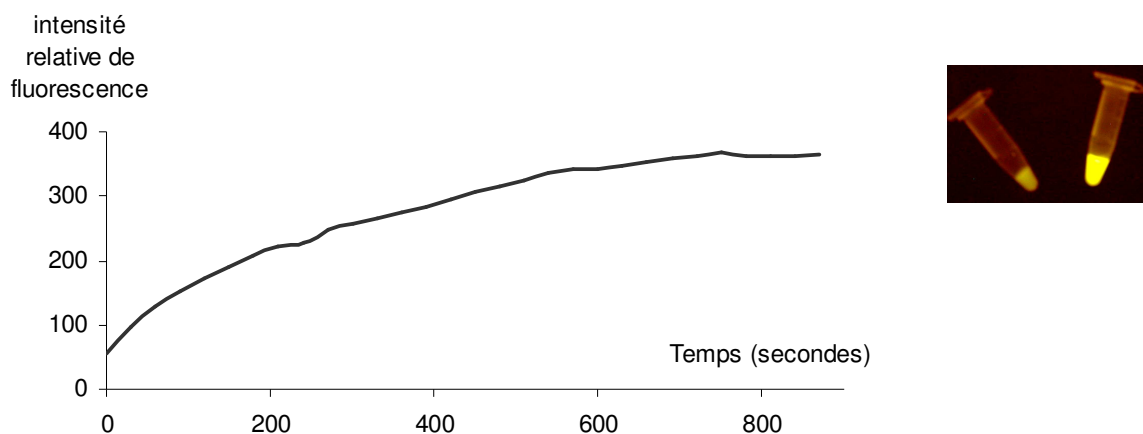


Figure 32: Cinétique de digestion de l'«hairpin O⁶-medG» (10 pmoles) par l'enzyme Nucléase P1 (dans le tampon Fpg 10 X⁽¹⁾ et à [NP1] = 1 Unité)

Photo représentant l' «hairpin O⁶-medG» (10pmoles dans tampon de la Fpg 10X) témoin et après digestion par la nucléase P1 après 30 minutes de réaction

⁽¹⁾ : 20mM Tris HCl pH=7,6 ; 1mM d'EDTA, 100mM KCl (tampon 1X)

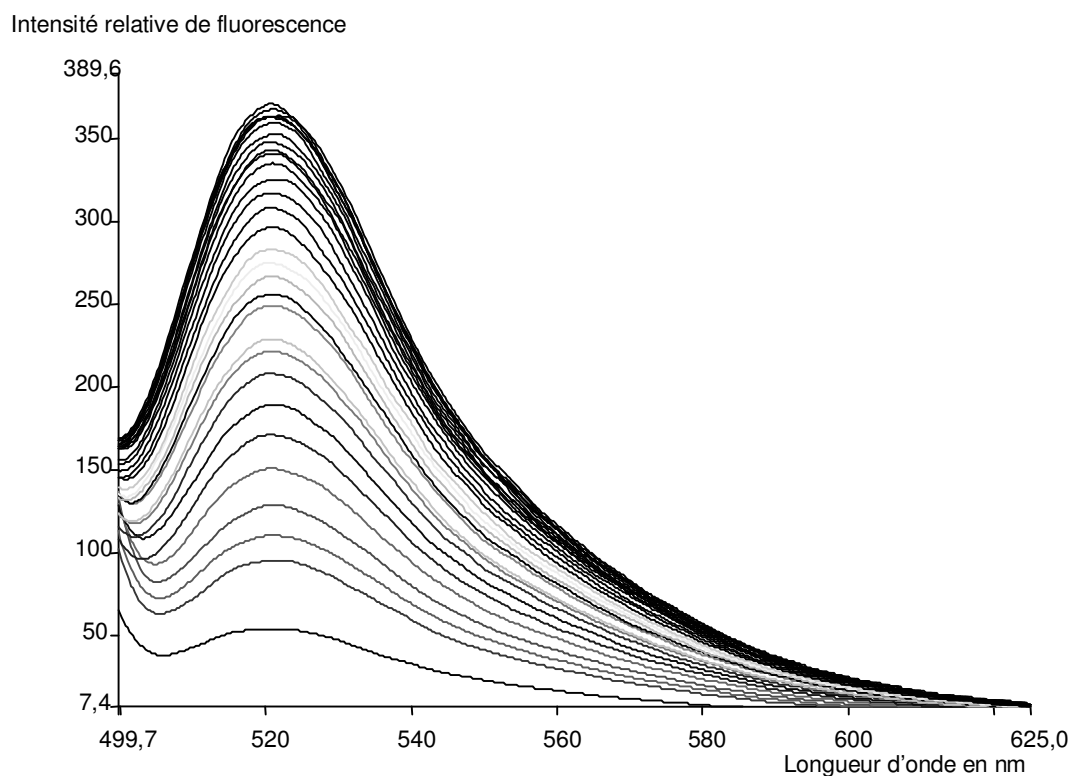


Figure 33: Evolution des spectres de fluorescence au cours de la cinétique de digestion de l' «hairpin O⁶-meG» par l'enzyme NP1 (mêmes conditions que celles présentées en Figure 5)

La Figure 32 a révélé un seuil de digestion de l'hairpin lésée O⁶meG par l'enzyme Nucléase P1 après 12 minutes 30 environ de temps réactionnel, correspondant à "l'écrasement" des spectres de fluorescence à partir d'une intensité relative de fluorescence égale à 360 (Figure 33). L'intensité relative de fluorescence maximale correspond aux 100% de coupure des "hairpins O⁶meG". La différence entre cette intensité maximale et l'intensité relative de fluorescence initiale a servi de référence pour les autres manipulations : pour 10 pmoles d'oligonucléotides, la différence de fluorescence maximale est $\Delta=320$. (L'intensité relative de fluorescence au départ est de 50, après réaction enzymatique elle s'élève à 370.) En accord avec le taux de quenching attendu, l'intensité relative de fluorescence a augmenté environ d'un facteur 6 à 7. Le temps nécessaire à la digestion totale des substrats oligonucléotidiques lésés par la Nucléase P1 a été équivalent à celui nécessaire dans le cas de substrats non lésés. Cela signifie que la lésion méthyle sur la position O⁶ de la base guanine n'a gêné en rien l'action de l'enzyme de digestion.

Ces différentes digestions enzymatiques ont permis tout d'abord de vérifier la présence de la fluorescéine et du dabcyI dans nos deux substrats nucléotidiques. Elles ont permis aussi de valider la fonctionnalité de ces nouvelles sondes fluorescentes en confirmant l'augmentation de l'émission de fluorescence à 520 nm lors de l'éloignement spatial du fluorophore de son quenchneur.

C. Mise en évidence de la réparation de la lésion O⁶-meGua par l'enzyme AGT

Comme exposé précédemment, la lésion O⁶-meGua est réparée par l'enzyme AGT. Cette enzyme qui agit par un mécanisme de réversion, n'a pas excisé la base lésée et n'a donc pas déstabilisé la structure du substrat oligonucléotidique par coupure. Il a donc été nécessaire de placer les substrats nucléotidiques en présence d'une autre enzyme de coupure qui a déstabilisé la structure (afin d'observer une émission de fluorescence par FRET). Pour ce faire, nous avons utilisé l'enzyme de restriction Pst I. Cette enzyme reconnaît uniquement son site de coupure lorsque la lésion sur la guanine est réparée par l'AGT. Le principe de cette technique est détaillé avec la figure 14.

Deux substrats oligonucléotidiques différents ont été utilisés, le témoin : l'"hairpin dG" et le substrat contenant la lésion alkyle : l'"hairpin O⁶meG"; leur structure correspond à celle détaillée précédemment (Figure 29).

1. Par PAGE

Avant de pouvoir étudier la réparation enzymatique par FRET, nous avons étudié si la lésion incorporée dans la structure "hairpin" était bien reconnue, réversée et coupée par les enzymes. Toutes les analyses de reconnaissance enzymatique ont été réalisées sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. L'activité enzymatique a pu être mise en évidence par la différence de migration entre les oligos non digérés et les oligos digérés. En effet, les séquences non digérées (35 bases) étaient plus longues que celles digérées (10 bases), ce qui a conduit à l'obtention de bandes de migration caractéristiques (Figure 34).

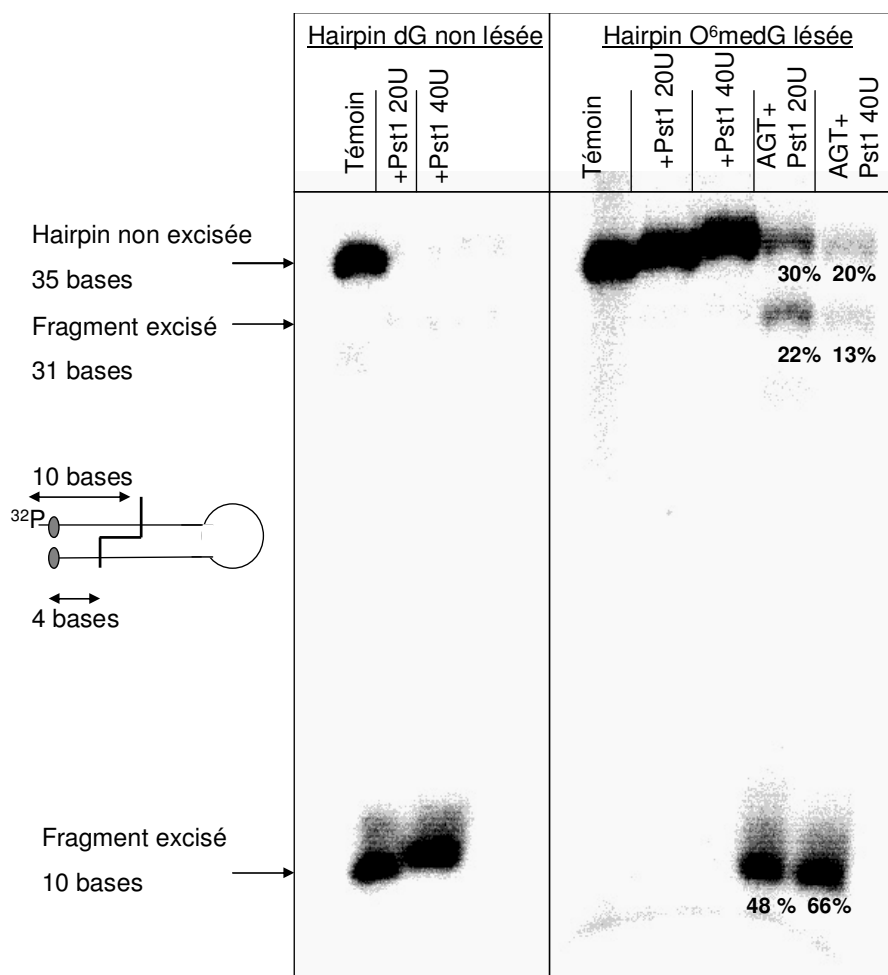


Figure 34: Autoradiographie du gel d'acrylamide représentant la migration des "hairpins" après réactions enzymatiques (Migration pendant 4 heures à 1800V)

Les résultats obtenus par PAGE ont bien révélé une coupure de l'"hairpin dG" témoin par l'enzyme de restriction Pst1. A l'aide du logiciel Quantity One, il a été possible de quantifier les pourcentages de coupure. Les concentrations d'enzymes utilisées dans cette manipulation ont induit une coupure à quasiment 100% de l'"hairpin dG" par la Pst1. La structure des sondes nucléotidiques autoccomplémentaires utilisées n'a pas empêché la reconnaissance du site de restriction par l'enzyme.

Conformément à nos attentes, l'"hairpin O⁶meG" a besoin d'être préalablement réparée par l'enzyme AGT afin d'être reconnue par l'enzyme de restriction Pst1. La lésion méthyle sur la position O⁶ de la base guanine n'a pas empêché la Pst1 de reconnaître son site de coupure spécifique. Lorsque la lésion O⁶-meGua a été réparée par l'enzyme AGT, alors le pourcentage de coupure a varié en fonction de la concentration de Pst1 : en passant de 20 à 40 unités d'enzyme Pst1, le pourcentage de coupure totale a augmenté de 70 à 80 %.

2. Par FRET

Le processus utilisé pour détecter les activités de réparations par émission de fluorescence est détaillé avec la Dabcyl Figure 35.

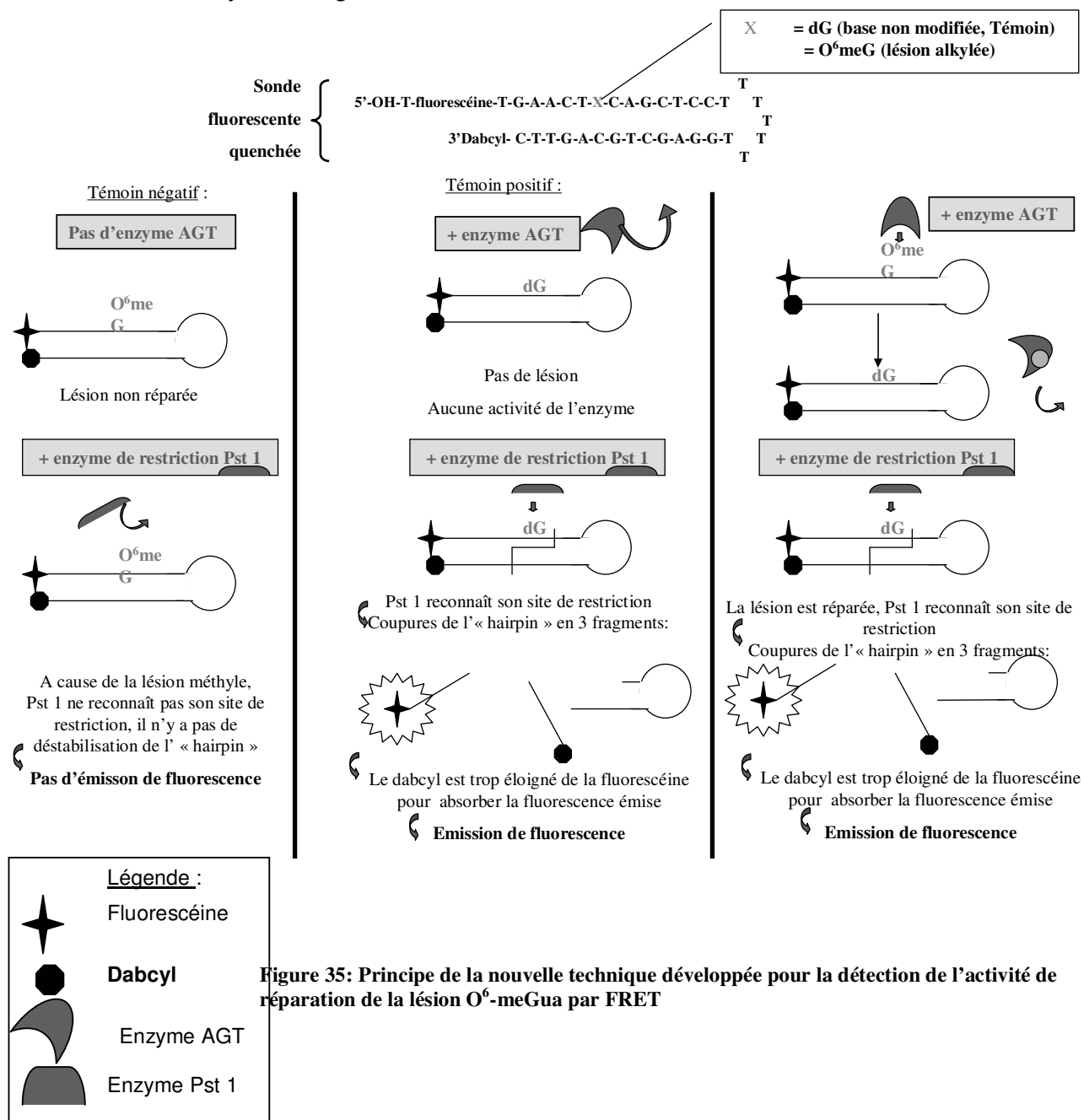


Figure 35: Principe de la nouvelle technique développée pour la détection de l'activité de réparation de la lésion O⁶-meGua par FRET

Nous avons observé la cinétique de digestion de l'« hairpin O⁶-meG » par l'enzyme Pst 1 après réparation de la lésion méthyle par l'enzyme AGT :

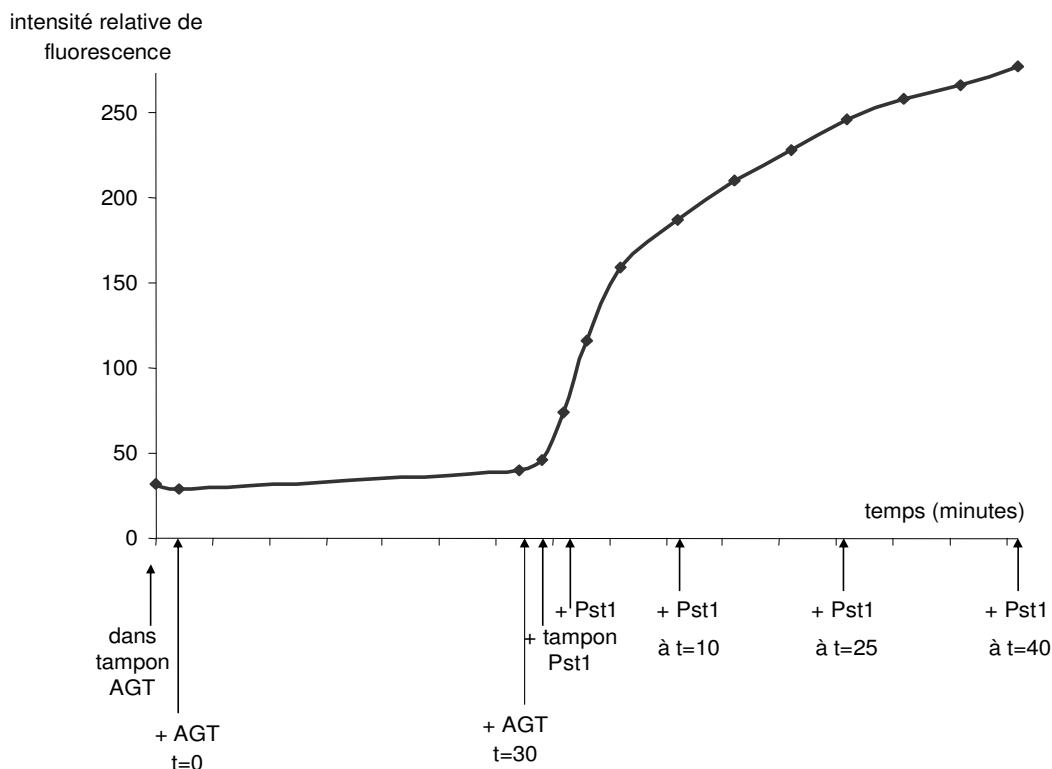


Figure 36: cinétique de réaction enzymatique de l'«hairpin O⁶-medG» (10 pmoles) par l'enzyme AGT (30 Unités) dans le tampon de l'AGT (1X) puis par l'enzyme de restriction Pst 1 (100 Unités) dans le tampon de la Pst1 (1X)

La méthode par FRET a bien révélé une augmentation de l'émission de fluorescence après ajout de l'enzyme Pst1, correspondant à l'éloignement spatial entre la fluorescéine et le dabcyI après la coupure de l'«hairpin O⁶medG». Les résultats précédemment obtenus par PAGE ont confirmé les résultats obtenus par FRET et ont permis d'affirmer que l'émission de fluorescence observée était bien issue de la coupure spécifique par la Pst1. Après 40 minutes de digestion par la Pst1, l'intensité relative de fluorescence a atteint les 270 ce qui correspond à un $\Delta = 230$, elle a augmenté environ d'un facteur 6 à 7. S'il on compare ce résultat à celui obtenu lors de la digestion par la Nucléase P1 ($\Delta = 320$), le taux de coupure ne s'est donc pas fait à 100%, il était d'environ 72%.

IV. Tests d'inhibition de l'AGT par FRET : Mesure de l'inhibition de l'AGT par l'O⁶-benzylGuanine

Les effets cytotoxiques des lésions alkylantes sur l'O⁶-Guanine peuvent être utilisés dans les chimiothérapies pour vaincre le cancer. De nombreux agents alkylants ont été développés et utilisés comme drogues anti-cancéreuses. Dans ces cas, la fonction de l'hAGT n'est pas désirée car elle répare et crée des résistances à la chimiothérapie. Comme cité auparavant, l'AGT est un

enzyme suicide qu'il suffit d'alkyler pour l'inactiver. Nous avons donc testé, par FRET, l'efficacité de l'inhibiteur de l'AGT le plus connu : l'O⁶-benzylGuanine.

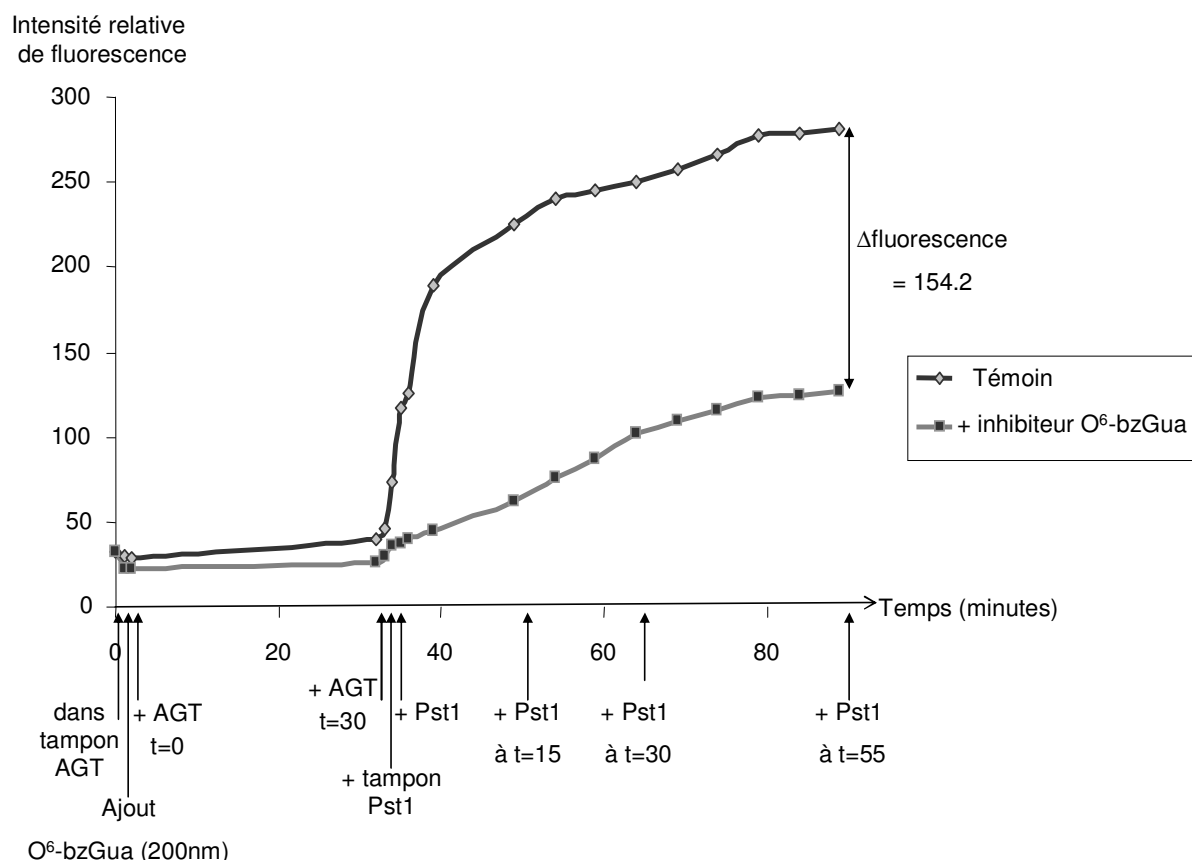


Figure 37: cinétique de réaction enzymatique de l'“hairpin O⁶-medG” (10 pmoles) par l'enzyme AGT (30 Unités), avec ou sans l'inhibiteur O⁶-bzGua (200 nmoles) dans le tampon de l'AGT (1X) puis par l'enzyme de restriction Pst 1 (100 Unités) dans le tampon de la Pst1

La O⁶-benzyleGua a une capacité d'alkylation de l'AGT élevée puisque l'intensité relative de fluorescence a fortement diminué. Ce nucléoside a montré une capacité d'inhibition de l'activité de réparation de l'AGT de 55%. Il faut noter que la concentration d'inhibiteur utilisée est supérieure à la concentration de substrat “hairpin O⁶meG” d'un facteur 20 000.

V. Conclusion

Les résultats obtenus sont concluants et les hypothèses de départ ont été confirmées : le FRET s'avère être une méthode analytique simple à mettre en œuvre, rapide, quantifiable et applicable à nos travaux sur la réparation de l'ADN. Nous avons montré que l'activité enzymatique de réparation de l'O⁶-meGua par l'enzyme AGT ainsi que les effets des différents inhibiteurs pouvaient être suivis en temps réel. Ce système "hairpin-FRET" est très prometteur de part ses applications potentielles en la santé publique (amélioration de l'efficacité des chimiothérapies, diagnostic de maladies, "screening" d'inhibiteurs...). Des agents alkylants thérapeutiques comme la temozolodine, la cyclophosphamide, la 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) et la dacarbazine sont administrés dans les cas de plusieurs cancers (ovaires, sarcome, mélanome, seins, langue, pancréas, colon et cerveau). Ces agents induisent notamment la formation de l'adduit O⁶-meGua dans les cellules tumorales mais des taux élevés de l'enzyme AGT ont été remarqués dans les tumeurs suite aux traitements chimiothérapeutiques (Hansen & Kelley, 2000). Nous avons testés par FRET trois inhibiteurs de l'AGT dans cette étude, seule la O⁶-benzyleGuanine s'est révélée être efficace mais à une concentration très élevée par rapport à la concentration de la sonde fluorescente. Il serait intéressant d'analyser l'effet des deux inhibiteurs oligonucléotidiques à la même concentration que la O⁶-benzyleGuanine et d'évaluer si l'AGT a moins d'affinité avec un oligonucléotide alkylé simple brin qu'avec un nucléoside alkylé. Il se peut aussi que l'enzyme AGT ait plus d'affinité envers les oligonucléotides doubles brins que simple brin. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tester les oligonucléotides de 14 bases de long mais en les mettant en présence de leur brin complémentaire afin de former des doubles brins. Grâce à un système "hairpin-FRET" sur biopuces, il serait possible de tester une grande combinaison d'inhibiteurs potentiels de l'AGT afin d'améliorer l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques. De plus, la réalisation de "screening" sur format microplaques diminue fortement les quantités de substrats et de réactifs nécessaires et permettrait donc de multiplier les expériences afin de rendre les résultats significatifs. Il serait également possible de détecter d'éventuelles déficiences en AGT à l'échelle de l'organe et ainsi prévenir l'apparition de cancer.

Bibliographie

- Chang, K.F., Fang, G.C., Chen, J.C., & Wu, Y.S. (2006) Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Asia: a review from 1999 to 2004. *Environ Pollut*, **142**, 388-96.
- Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbo, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., & Krokan, H.E. (2004) Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1389-407.
- Duguid, E.M., Rice, P.A., & He, C. (2005) The structure of the human AGT protein bound to DNA and its implications for damage detection. *J Mol Biol*, **350**, 657-66.
- Hansen, W.K. & Kelley, M.R. (2000) Review of mammalian DNA repair and translational implications. *J Pharmacol Exp Ther*, **295**, 1-9.
- Hecht, S.S. (1999) DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res*, **424**, 127-42.
- Meyer, A.S., McCain, M.D., Fang, Q., Pegg, A.E., & Spratt, T.E. (2003) O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferases repair O⁶-methylguanine in DNA with Michaelis-Menten-like kinetics. *Chem Res Toxicol*, **16**, 1405-9.
- Mishina, Y., Duguid, E.M., & He, C. (2006) Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chem Rev*, **106**, 215-32.

Annexe 3 : Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

Annexe 3 : Matériel et Méthodes

I.	Synthèse chimique d'ADN.....	244
	A. Réactifs, synthèse sur support solide et purification des oligonucléotides.....	244
	B. Déprotection des oligonucléotides	244
II.	Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).....	245
III.	Analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF	245
IV.	Analyse caractéristique par radioactivité : Test EGPA	246
	A. Marquage radioactif au ³² -P	246
	B. Analyse des sondes oligonucléotidiques radioactives en présence de glycosylases ou de Nucléase P1	246
	C. Enzymes et tampons enzymatiques	246
V.	Analyse par suivi de l'inhibition du « quenching » de fluorescence	247

I. Synthèse chimique d'ADN

A. Réactifs, synthèse sur support solide et purification des oligonucléotides

Les produits utilisés pour la synthèse oligonucléotidique (solvants, supports, réactifs et synthons modifiés et normaux) selon la méthode aux phosphoramidites sont d'origine commerciale (Applied Biosystems, Fostercity, USA ; Glen Research, Sterling, USA) à l'exception du synthon diol de thymine (Gasparutto, D., Cognet, S., Roussel, S., & Cadet, J. (2005) Synthesis of a convenient thymidine glycol phosphoramidite monomer and its site-specific incorporation into DNA fragments. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 1831-42.). Les différents synthons phosphoramidites ont été mis en solution dans de l'acétonitrile anhydre. La synthèse a été effectuée à l'échelle 1 μ mole sur un synthétiseur Applied Biosystems 392 (Applied Biosystems, Fostercity, USA) en conservant le groupement 4,4'-diméthoxytrytile terminal. Les temps de réaction de couplage sont environ de 30 secondes par synthon et sont augmentés pour l'insertion de synthons modifiés. La réaction de détrytilation est effectuée à chaque cycle avec une solution de TCA à 2% dans CH_2Cl_2 . L'étape d'oxydation est effectuée avec une solution d'iode 0,02 M dans un mélange de solvants eau/pyridine/THF. L'étape de « capping » est effectuée en traitant le brut de synthèse par une solution d'anhydride phénoxyacétique et de méthyle imidazole dans du THF.

B. Déprotection des oligonucléotides

Les supports solides sont transférés dans des tubes eppendorf à bouchon vissé et incubés dans 1 ml d'ammoniaque concentrée (32 %), sous agitation et à température ambiante pendant 5 h. Le mélange brut de déprotection est alors évaporé sous pression réduite. Chaque oligonucléotide en solution est quantifié par spectroscopie UV. Les oligonucléotides sont ensuite purifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant puis dessalés sur colonne d'exclusion NAP (Pharmacia, Uppsala, Suède) avant une purification finale par CLHP sur colonne de phase inverse C18. Les oligonucléotides purifiés sont quantifiés par spectroscopie UV et analysés par spectrométrie de masse MALDI-ToF.

II. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

La purification et l'analyse des oligonucléotides sont effectuées sur la même colonne.

Système de purification : Colonne Uptisphère C18 (300 Å, 250 mm x 4,6 mm) en mode gradient. Eluant : TEAA (acétate de triéthyle ammonium) 10 mM et un gradient d'acétonitrile de 5 à 25 % en 45 min. Débit : 1 ml/min.

Système analytique : Colonne Uptisphère C18 (300 Å, 250 mm x 4,6 mm) en mode gradient. Eluant : TEAA 10 mM et un gradient d'acétonitrile de 17 à 25 % en 20 min. Débit : 1 ml/min.

III. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF

Les spectres de masse MALDI-ToF (désorption et ionisation laser assistées par matrice en association à un analyseur de temps de vol) ont été obtenus sur un appareil Biflex (Brucker, Wissenbourg, France).

La matrice est constituée d'acide 3-hydroxypicolinique (35 mg) dissout dans 1 ml d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium (100 µM). L'échantillon, constitué de 50 pmol d'oligonucléotide, est dissout dans 1 ml d'eau désionisée. Une fraction de 1 µl de cette solution à analyser est déposée avec 1 µl de matrice sur la cible et l'ensemble est laissé à l'air libre afin de sécher. Pour certaines analyses effectuées sur de faibles quantités de matériel, on peut concentrer l'échantillon en utilisant des supports « Zip-Tip » de dessalage (Waters, France). Les spectres sont enregistrés à partir de 40 impulsions laser, les ions étant accélérés avec une tension d'extraction de 19 kV. L'instrument est préalablement calibré avec une solution d'oligonucléotide de masse connue. L'échantillon est désorbé par bombardement laser. Le parcours (ou temps de vol) des ions dans le détecteur est directement proportionnel à leur masse, ce qui autorise leur caractérisation

IV. Analyse caractéristique par radioactivité : Test EGPA

A. Marquage radioactif au $^{32}\text{-P}$

10 à 40 pmol d'oligonucléotide sont dissous dans 6,5 µl d'eau. On ajoute ensuite 1 µl de [$\gamma^{32}\text{-P}$] ATP (25 µl à 250 µCi / µl Amersham Biosciences, Orsay, France), 2,5 µl de tampon enzymatique 4X et 1 unité de T4 polynucléotide kinase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le mélange réactionnel est incubé durant 1 h à 37 °C, puis les oligonucléotides sont purifiés sur une colonne d'exclusion de type G-25 « microspin » (Amersham Biosciences, Orsay, France).

Analyse des substrats radioactifs en présence de glycosylases et de Nucléase

B. Analyse des sondes oligonucléotidiques radioactives en présence de glycosylases ou de Nucléase P1

Les oligonucléotides (1 pmol) préalablement marqués à leur extrémité 5' au [$\gamma^{32}\text{-P}$], sont mis en présence de concentrations croissantes de glycosylases (ou de la nucléase P1 0,02 U) en solution dans le tampon enzymatique 1X composé de 25 mM Tris-HCl, 2 mM Na_2EDTA et 50 mM NaCl, pH 7,6. Le volume final de réaction est 10 µl. L'incubation de l'enzyme en présence du substrat est effectuée pendant 40 min. En fin de réaction, un mélange de « bleu formamide » (Bleu de bromophénol 0,025 %, xylène cyanol 0,025 %, EDTA 0,5 mM et formamide 95 %) est ajouté. L'ensemble est porté à 90 °C pendant 3 minutes avant d'être déposé sur gel de polyacrylamide à 15 % dénaturant (urée 8 M).

C. Enzymes et tampons enzymatiques

Les enzymes purifiées, Fpg, Alk A, Endo III d'*E. Coli*, yOgg1 de *S. Cerevisiae* ont été fournies par le Dr Serge Boiteux (CEA/Fontenay-aux-Roses, France).

L'enzyme UNG est d'origine commerciale (Invitrogen, France).

L'inhibiteur de l'UNG (UGi) a été fourni par le Pr Wim Burmeister (IVMS, EMBL, Grenoble, France).

La nucléase P1 provient de chez Sigma (St Quentin-Fallavier, France).

Les réactions enzymatiques en présence des glycosylases mentionnées (Fpg : 2,6 µg/µl ; Endo III : 2,2 µg/µl, yOgg1 : 1,7 µg/µl, UNG : 2 U/µl) sont effectuées dans le tampon 1 X précédemment décrit, composé de 25 mM Tris-HCl, 2 mM Na₂EDTA et 50 mM NaCl, pH 7,6. Les réactions enzymatiques de digestion par la Nucléase P1 (0,2 U/µl) se font également dans ce tampon.

V. Analyse par suivi de l'inhibition du « quenching » de fluorescence

Les oligonucléotides (généralement 10 pmol) sont mis en solution dans un volume réactionnel final de 100 µl, composé de 75 µl d'eau désionisée et 25 µl de tampon enzymatique 4X. Les enzymes étudiées sont mises à incuber dans ce mélange réactionnel à la concentration désirée et l'ensemble est transféré dans une cuve en quartz pour lecture de fluorescence sur le spectrofluorimètre LS 50 B (Perkin Elmer), préalablement thermostaté à 37°C à l'aide d'un bain-marie externe. La lecture de fluorescence se fait après excitation à 492 nm pour le FLUO-dT ou 559 nm pour le TAMRA-dT. L'émission est recueillie à 520 nm pour le FLUO-dT et 580 nm pour le TAMRA-dT. Les mélanges réactionnels peuvent aussi être analysés sur microplaque (à fond noir 96 puits spécial fluorescence, Perkin Elmer) à l'aide du lecteur microplaque VICTOR 3, thermostaté à 37°C. Le signal de fluorescence est traité par le logiciel de traitement de signaux Wallac 1420 (Perkin Elmer). L'ensemble est calibré aux mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission que le spectrofluorimètre LS 50 B.

Nouvelles sondes nucléiques pour la mesure d'activités enzymatiques de réparation des dommages de l'ADN par un test de fluorescence

Les méthodes classiques disponibles pour mesurer l'activité enzymatique de réparation des lésions de l'ADN par des ADN *N*-glycosylases sont longues et laborieuses à mettre en œuvre (analyse par électrophorèse sur gel couplée au marquage par un isotope radioactif ou encore par chromatographie liquide haute performance). Nous avons développé dans le présent travail, une nouvelle méthode de quantification précise et aisée des activités de réparation basée sur une détection utilisant le principe physique du FRET (transfert par résonance d'énergie de fluorescence). Pour ce faire, un substrat d'ADN original a été conçu : une structure autoccomplémentaire contenant des lésions spécifiques dans la séquence double brin de l'épingle à cheveux et, ayant les deux extrémités marquées par des fluorophores. L'excision de la lésion par des ADN *N*-glycosylases conduit à la séparation des brins complémentaires, induisant une diminution du processus de « quenching » de fluorescence. L'activité d'excision est donc détectée et quantifiée par l'augmentation de l'intensité du signal d'émission du fluorophore. Après avoir établi la linéarité de la réponse de ce test, nous avons utilisé cette approche expérimentale pour accéder aux paramètres cinétiques caractéristiques des enzymes de réparation. La validité de ces paramètres a été contrôlée par comparaison avec les données obtenues par analyse sur gel d'acrylamide (EGPA). Les possibles applications de notre test en tant qu'outil de screening pour la détection d'activité de réparation ou d'inhibition enzymatique, sur enzymes purifiées ou à partir d'extraits cellulaires ont été investiguées. Enfin, un projet de miniaturisation du format de lecture dans un microsystème de type « lab-on-a-chip » a été mené. L'ensemble des résultats obtenus prouve la pertinence de notre méthode d'analyse en phase homogène, en vue d'extensions à l'analyse parallélisée haut débit pour des applications en recherche fondamentale, biomédicale et pharmaceutique.

Mots clés : FRET, ADN *N*-Glycosylases, sondes oligonucléotidiques, lésions de l'ADN, inhibiteurs de la réparation, miniaturisation en format « lab-on-a-chip », extraits cellulaires

New nucleic acid probes to analyze enzymatic DNA repair activities by a fluorescence-based assay

Classical analysis methods for enzymatic DNA repair activity monitoring are tedious and time-consuming (gel electrophoresis coupled to isotope labeling or high performance liquid chromatography). Hence, we developed a new DNA repair assay based on FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) detection. This has required the design of an original DNA probe: a hairpin structure containing specific lesions located at defined sites within the stem sequence, close to the fluorophore-labeled extremities. The lesion excision by DNA *N*-glycosylases leads to the complementary strand separation, causing a drop in fluorescence quenching. Thus, the cleavage extent is reflected by the fluorophore emission intensity increase and stabilization over the repair reaction time-course. After proving the linearity of the assay response, we demonstrated the ability of the current method to give access to repair enzyme kinetic parameters. The relevance of these parameters was checked by comparison to values, obtained by PAGE analyses. Then, we investigated the capability of our test to be used as a high-throughput screening tool to quantify enzymatic repair activities and check inhibition effects (by using purified enzymes or cell extracts). Finally, a miniaturization project was carried out to improve the sensitivity of this new detection method. The performance of this homogeneous liquid-phase assay should lead to applications in the bioanalytical field related to fundamental, biomedical and pharmaceutical research.

Keywords: FRET, DNA *N*-glycosylases, oligonucleotide probes, DNA lesions, repair inhibitors, lab-on-a-chip format, cellular extracts